



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS HIFENADAS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE PROGRAMAÇÕES PARA
ANALISE DE *ACMELLA OLERACEA* (L.) RK JANSEN**

Ianna Dias Ribeiro da Silva

BELÉM – PA
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS HIFENADAS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE PROGRAMAÇÕES PARA
ANALISE DE *ACMELLA OLERACEA* (L.) RK JANSEN**

Autor: Ianna Dias Ribeiro da Silva
Orientador: Profº Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa
Coorientadora: Dra. Monaliza Maia Rebelo de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito total para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA
2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ianna Dias Ribeiro da Silva

UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS HIFENADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PROGRAMAÇÕES PARA ANALISE DE *ACMELLA OLERACEA* (L.) RK JANSEN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito total para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas
Área de concentração: Farmacos e Medicamentos

Aprovado em :

Banca Examinadora

Profº Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa

Assinatura: _____ Instituição: UFPA

Profª Drª Alaide Braga de Oliveira

Assinatura: _____ Instituição: UFPA

Profª Drª Cristine Bastos do Amarante

Assinatura: _____ Instituição: MPEG

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por sempre ser a fonte da minha força.

A minha mãe Suely e minha avó Jacyra, que são a minha base, a minha família e meus exemplos.

A UFPA, especialmente a Secretaria e a Coordenação Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas representada pelas Sras. Cliciane Melo e Maria Brasília Quaresma e pelo Prof^o Dr. José Luiz Vieira.

Ao meu orientador Prof. Wagner Barbosa, pelos ensinamentos e conhecimentos repassados nestes dois anos e principalmente pela oportunidade concedida.

À minha coorientadora Dra. Monaliza Maia, que foi essencial no desenvolvimento deste trabalho, sempre com sugestões coerentes, não há palavras para expressar todo o meu agradecimento.

Aos amigos que ganhei LACREM (Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas).

Agradeço a todos os amigos e familiares que torcem pelo meu sucesso.

Obrigada!

RESUMO

SILVA, I.D.R. UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS HIFENADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PROGRAMAÇÕES PARA ANÁLISE DE *ACMELLA OLERACEA* (L.) RK JANSEN. 2016.65f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará. 2016.

O emprego de técnicas hifenadas que permitam a separação e o isolamento de substâncias de um extrato vegetal mostra-se necessário tanto para o conhecimento da composição química, de um composto, como também para a determinação de uma substância, ou grupo de substâncias, que sirvam como marcadora de determinada espécie. A espécie *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen, cresce na Amazônia Legal, uma região sociogeográfica no norte do Brasil, onde é conhecido como Jambu, Agrião Bravo ou Agrião do Pará. É utilizada na medicina popular na forma de chá, xaropes e tinturas e indicada para o uso como anestésico e antisséptico. O objetivo deste trabalho foi utilizar a HPLC-UV-ELSD e a UHPLC-DAD-MS para o desenvolvimento de programações que possam identificar metabólitos de interesse em *Acmella oleracea*. O material vegetal foi adquirido no município de Tailândia, estado do Pará, sítio Santa Inês na microrregião de Tomé-Açu as margens da rodovia PA150, posicionado a 260 km da capital Belém, nas coordenadas 02°56'22" de latitude sul e 48°57'03" de longitude oeste, e consistia de 10 maços de *Acmella oleracea* (jambu) frescos, compostos de folhas, flor, raiz e caule, após a higienização o material in natura foi triturado e em seguida macerado por 7 dias com etanol a 92,8 °GL numa proporção de 1:10. Os extratos hidroetanólicos, de cada parte da planta, foram filtrados e concentrados a baixa pressão e em seguida liofilizados para posterior análise com técnicas hifenadas. O espilantol foi registrado nas análises por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo Scan e Produto de íon, através da detecção do íon m/z 222 em todos os órgãos analisados. Uma substância que apresentou m/z 376.80 para análise com etoh/água e m/z 388.20 para acn/água, que apresenta perfil promissor foi encontrada através das análises por UHPLC-DAD-MS e precisa de experimentos específicos para a confirmação de flavonoides. Durante o desenvolvimento das programações, observou-se que os melhores perfis cromatográficos de EEAFOC e EEAOR foram obtidos quando a fase móvel era composta por etanol e água.

Palavras-chave: UHPLC-DAD-MS; Técnicas hifenadas; Jambu; espilantol

ABSTRACT

SILVA, I.D.R. **Use of hyphenated techniques in developing methods for *Acmella oleracea* (L.) R.K. JANSEN. Dissertation (Master).** Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará. 2016.

The use of hyphenated techniques that allow the separation and isolation of substances of a herbal extracts is necessary both for the knowledge of the chemical composition of a compound, as well as for the determination of a substance or a group that serve as marker of particular species. The species *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, grows in Legal Amazon, a geographic region in northern Brazil, where is known as Jambu, Agrião Bravo ou Agrião do Pará. It is used in folk medicine in the form of tea, syrups and tinctures and indicated for use as anesthetic and antiseptic. The aim of this study was to use the HPLC-UV-ELSD and HPLC-DAD-MS for the development of methods that can identify metabolites of interest on *Acmella oleracea*. The plant material was acquired in Tailândia, State of Pará, in the Santa Inês farm, city of Tomé-Açu, PA150 highway margins, positioned the 260 km from Belém, at 02° 56 ' 22 " south latitude and 48° 57 ' 03 " west longitude, and consisted of 10 packs of *Acmella oleracea* (jambu), composed of leaves, flower, root and stem, after cleaning the material was grinded and then macerated for 7 days with 92.8° GL ethanol at a ratio of 1:10. Hydroethanolic extracts, of each part of the plant, were filtered and concentrated at a low pressure and then lyophilized for further analysis with hyphenated techniques. The Spilanthol was registered in the analysis by HPLC-DAD-ESI-MS, Scan mode and Product ion, through the detection of ion m/z 222 in all analyzed organs. A substance which showed m/z 376.80 for analysis with etoh/water and m/z 388.20 for acn/water, which has promising profile was found through the analysis by HPLC-DAD-MS and needs specific experiments for confirmation of flavonoids. During the development of methods, it was observed that the best chromatographic profiles of EEAFOC and EEAOR were obtained when the mobile phase was composed of ethanol and water

Key words: HPLC-DAD-MS; hyphenated techniques; Jambu; Spilanthol

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	<i>Acmella uliginosa</i> (Sw.) Cass (Representante do gênero <i>Acmella</i>)	17
Figura 2 -	<i>Acmella oleracea</i> (Jambu) obtido após coleta	19
Figura 3 -	Estrutura do espilantol: N isobutyl-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamida	20
Figura 4 -	Representação esquemática da fonte de ionização por nebulização eletrônica	24
Figura 5 -	Formação de íons em Eletrospray	24
Figura 6 -	Cromatograma Anisaldeído sob Luz Visível	33
Figura 7 -	Cromatograma 254 nm	33
Figura 8 -	Cromatograma 365 nm	33
Figura 9 -	β -mirceno	35
Figura 10-	dictamnol	35
Figura 11-	germacreno D	35
Figura 12-	β -pineno	35
Figura 13 -	Cromatograma EEAOFI	35
Figura 14 -	Estrutura do grupo funcional das alcanidas	36
Figura 15 -	Cromatograma de EEAOFI obtido por espalhamento de luz evaporativo (ELSD)	37
Figura 16 -	Cromatograma de EEAOFI registrado a 200 nm por HPLC-UV-ELSD.	37
Figura 17 -	Cromatograma de EEAOFI registrado a 230 nm por HPLC-UV-ELSD.	37
Figura 18 -	Cromatograma de EEAOFI registrado a 275 nm por HPLC-UV-ELSD.	38
Figura 19 -	Cromatograma de EEAOFI registrado a 365 nm por HPLC-UV-ELSD.	38
Figura 20 -	Cromatograma de FLMEOH obtido por espalhamento de luz evaporativo (ELSD)	39
Figura 21 -	Cromatograma de FLMEOH de flor registrado a 200 nm por HPLC-UV-ELSD	39
Figura 22 -	Cromatograma de FLMEOH de registrado a 230 nm por HPLC-UV-ELSD	39
Figura 23 -	Cromatograma de FLMEOH registrado a 275 nm por HPLC-UV-ELSD	39
Figura 24 -	Cromatograma de FLMEOH registrado a 365 nm por HPLC-UV-ELSD.	40
Figura 25 -	Cromatogramas de FL20 registrados por UHPLC-DAD a 250 nm (A) e 260 nm (B) em modo gradiente linear 98% de água a pH 3 (ácido fórmico) a 98% de ACN ,fluxo 0,150 mL/min.	42
Figura 26 -	Cromatogramas de FL20 registrados por UHPLC-DAD a 250 (26a) e 260 nm (26b) em modo gradiente linear 98% de água a pH 3 (ácido fórmico) a 98% de ACN com fluxo 0,05 mL/min..	43

Figura 27 -	Cromatogramas de FL20 registrados em UHPLC-DAD a 250 nm (A) e 260 nm (B) em modo isocrático 70:30 (ACN/água pH 3 ácido fórmico), fluxo 0,150 mL/min.	44
Figura 28 -	Cromatograma de FL20 registrado em UHPLC-DAD a 270 nm em modo isocrático 70:30 (ACN/água pH 3 ácido fórmico), fluxo 0,05 mL/min.	46
Figura 29-	Cromatograma de íons totais de FL20 (TIC em inglês) e espectro de massas obtido em modo Scan por UHPLC-DAD-ESI-MS.	47
Figura 30-	Cromatograma de Íon Extraído (EIC em inglês) de FL20, modo isocrático 60 % acetonitrila 40% água, fluxo 0,05 mL/min.	48
Figura 31-	Cromatograma de íons totais (TIC em inglês) e espectro de massas de FOCM obtidos em modo positivo, Scan, por UHPLC-DAD-ESI-MS	49
Figura 32-	Cromatograma em 260 nm e espectro no ultravioleta de FOCM obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo gradiente com 50 % etanol e 50% de água por 1 minuto, 1 a 11 minutos 50% a 95% de etanol, 11 a 15 minutos 95% de etanol e 5% de água, 15 a 20 minutos 95% a 50% de etanol, 20 a 25 minutos 50 % de etanol e 50% de água, fluxo 0,4 mL/min..	50
Figura 33-	Cromatograma de íons totais e espectro de massas de RM obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo gradiente com 50 % etanol e 50% de água por 1 minuto, 1 a 11 minutos 50% a 95% de etanol, 11 a 15 minutos 95% de etanol e 5% de água, 15 a 20 minutos 95% a 50% de etanol, 20 a 25 minutos 50 % de etanol e 50% de água, fluxo 0,4 mL/min	50
Figura 34 –	TIC referente ao m/z 222 com espectro de fragmentação de FOCM obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo positivo, Product Ion	52
Figura 35 –	TIC referente ao m/z 222 com espectro de fragmentação de FOCM, obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo positivo, Product Ion	53
Figura 36 –	TIC referente ao m/z 222 com espectro de fragmentação de RM, obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo positivo, ESI Product Ion	52
Figura 37-	Cromatogramas de FOCAE obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em 365 nm para Fase móvel etoh/água e ACN/água, respectivamente	56
Figura 38-	Espectros de massa obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS no modo positivo, Scan de FOCAE.	57
Figura 39-	Cromatograma de íons totais (TIC) de FOCM com ETOH/água (A) e ACN/água (B)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Rendimento da extração das diferentes partes botânicas de <i>Acmella oleracea</i> com etanol 96° GL.	30
Tabela 2 -	Classes metabólicas detectadas por via úmida em <i>Acmella oleracea</i>	31
Tabela 3 -	Perfil de fragmentação do espectro de massas	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

ACN	Acetonirila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
CLAE UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Ultravioleta
DAD	Detector de Arranjo Diodos
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
EM	Espectrometria de Massas
EIC	<i>Extraction íon chromatogram</i>
EC	Eletroforese Capilar
ETOH	Etanol
EEOFL	Extrato etanólico de <i>Acmella oleracea</i> Flor
EEOC	Extrato etanólico de <i>Acmella oleracea</i> Caule
EEOA	Extrato etanólico de <i>Acmella oleracea</i> Raiz
EEOFO	Extrato etanólico de <i>Acmella oleracea</i> Folha
EEOFOC	Extrato etanólico de <i>Acmella oleracea</i> Folha+Caule
FL05	Flor 0 a 5 minutos
FL15	Flor 15 minutos
FL20	Flor 20 minutos
FLDCM	Flor fração diclorometano
FLMEOH	Flor fração metanólica
FOCM	Folha+Caule fração metanólica
FOCAE	Folha+Caule fração acetato de etila
IQPA	Ionização Química a Pressão Atmosférica
IR	Índice de retenção
Min	Minutos
mL	Mililitro
mg	Miligrama
nm	Nanômetros

pH	potencial Hidrogeniônico
Rf	Tempo de retenção
RM	Raiz fração metanólica
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TSP	<i>Thermospray</i>
Uv-Vis	Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{GL}$	Gay-Lussac
μL	Microlitro
+	Positivo
-	Negativo
λ	Lambda
m/z	Relação massa/carga
'	Minuto (unidades de ângulo)
''	Segundo (unidades de ângulo)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Gênero <i>Acmella</i>	17
2.2	A espécie <i>Acmella oleracea</i>	18
2.3	Técnicas hífenadas	21
2.3.1	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA-ULTRAVIOLETA (CLAE-UV)	21
2.3.2	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM)	22
3	OBJETIVO GERAL	25
3.1	Objetivos específicos	25
4	MATERIAIS E METODOS	26
4.1	Obtenção do material vegetal	26
4.2	Preparação da droga vegetal	26
4.3	Fracionamento do extrato	26
4.4	Abordagem fitoquímica por via úmida do extrato e frações	27
4.5	Determinação do perfil cromatográfico do extrato e frações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e técnicas hífenadas	27
4.5.1	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	27
4.5.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC-UV-ELSD)	28
4.5.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (UHPLC-ESI-MS)	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Abordagem Fitoquímica por via úmida	30
5.2	Análise por Cromatografia em Camada Delgada	33

5.3	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV-ELSD)	37
5.4	Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC-DAD)	41
5.5	Análise por Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas (UHPLC-DAD-EM)	47
5.6	Uso de etanol como fase móvel	59
6	CONCLUSÃO	61
7	REFERENCIAS	62
	APENDICE A – Origem das siglas de extratos e frações	67

1 INTRODUÇÃO

Um perfil metabólico pode ser definido como um conjunto de sinais cromatográficos e/ou espectroscópicos adquiridos a partir de uma amostra complexa de extratos vegetais, obtidos usando-se métodos analíticos que revelem todas as características químicas inerentes a determinados padrões funcionais e estruturais das classes de produtos naturais analisadas (WOLFENDER, 2009; JIANG, 2010; CIEŚLA, 2012)

O mapeamento completo da constituição metabólica exige, necessariamente, o uso de instrumentos e de técnicas analíticas avançadas e seletivas, de alto desempenho, que possibilitem com segurança a identificação de diferentes classes de compostos micromoleculares em um extrato à base de plantas (FUNARI et al 2013; RODRIGUES et al, 2006).

A utilização de perfis cromatográficos para análise de extratos vegetais possibilita obter representatividade dos múltiplos compostos químicos presentes na amostra em uma única análise estabelecendo semelhanças e diferenças entre extratos obtidos sob as mesmas condições de análise (ALAERTS et al, 2007).

O termo, técnicas hifenadas, refere-se ao acoplamento de duas ou mais técnicas analíticas, visando obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida que as técnicas não combinadas. As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos à base de plantas medicinais são a cromatografia (CL; cromatografia a líquido e CG; cromatografia a gás), a espectroscopia no ultravioleta (UV ou DAD; que utiliza arranjo de diodos), espectrometria de massas (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN) (RODRIGUES, 2006).

As técnicas hifenadas ou acopladas, tais como CL-UV e CL-EM, proporcionam uma análise rápida de produtos naturais em misturas complexas. Um grande número de informações sobre o conteúdo do extrato pode ser obtido graças às informações obtidas em linha. De acordo com as informações estruturais fornecidas, é possível identificar uma determinada substância nova ou se caracterizar uma substância já conhecida. (QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN K., 2013)

O emprego de técnicas cromatográficas e analíticas que permitam a separação e o isolamento de substâncias de um extrato vegetal mostra-se

necessário tanto para o conhecimento da composição química, de um composto, como também para a determinação de uma substância, ou grupo de substâncias, que sirvam como marcadora daquela espécie. (DRASARA & MORAVCOVA, 2004; FAMEI et al., 2006; LIU et al., 2007)

A espécie *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (var. *Spilanthes oleracea*; syn. *Spilanthes acmella* var. *oleracea*), cresce na Amazônia Legal, uma região sociogeográfica no norte do Brasil, onde é conhecido como Jambu, Agrião Bravo ou Agrião do Pará. (NASCIMENTO, 2013)

A composição química descrita na literatura inclui a alcanida espilantol, éster de α e β -amyrin, estigmasterol, glicosídeos, sitosterol, saponinas, triterpenos, cumarina (escopoletina) e ácido ferúlico (LEMOS 2012; PRACHAYASITTIKUL, 2009).

O uso tradicional do jambu na gastronomia cultural paraense destina-se para o pato-no-tucupi e tacacá (HOMMA, 2011). A planta é utilizada na medicina popular na forma de chá, xaropes e tinturas (OLIVEIRA et al, 2004) e é indicada para o uso como anestésico e antisséptico (DIAS et al, 2011). Ratnasooriya et al. (2004) em experimento com o Jambu, concluíram que a mesma possui atividade diurética. A atividade microbiológica da fração clorofórmica contra cepas de *Salmonella tiphy* foi comprovada em 2015 por Alcantara et al. Segundo Borges (2012), os efeitos farmacológicos devem-se às suas substâncias químicas, dentre elas a alcanida espilantol.

Os extratos de *Acmella* (*Spilanthes*) também são efetivos contra parasitas da malária, especificamente formas espiroquetas, tanto como profilático quanto no tratamento do paroxismo malárico (B&T WORD SEEDS, 2010). Na região amazônica tem sido usado, por leigos, para tuberculose (STOREY; SALEM, 1997).

Essa planta, por apresentar essas propriedades previamente conhecidas, vem despertando o interesse de empresas farmacêuticas, cosméticas e de alimentos, que vem utilizando esta espécie como matéria prima para seus produtos (SILVA BORGES et al, 2014).

O desafio atual é utilizar técnicas hífenadas para o desenvolvimento de programações que possam identificar metabólitos de interesse em *Acmella oleracea*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Acmella*

O gênero *Acmella* é pantropical, com espécies ocorrentes em diversos continentes, como na América do Norte, América Central e do Sul; África (Madagascar); na Ásia; e Oceania (Silva e Santos, 2011). Moore (1906) considerou este gênero como uma seção de *Spilanthes* Jacq. que compreendia 26 espécies.

As espécies de *Acmella* são geralmente caracterizadas como ervas, eretas ou decumbentes (JANSEN, 1985), características pertencentes a família Asteraceae, que possuem hábitos variados, dentre eles: ervas, subarbustos, trepadeiras ou, excepcionalmente, árvores (LORENZI & MATOS, 2002).

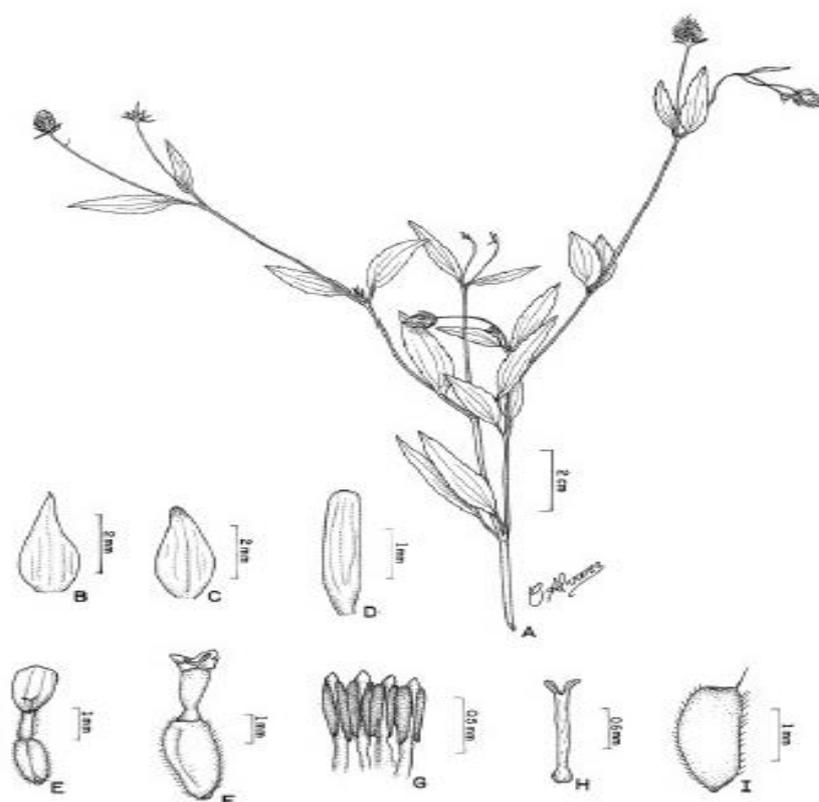


Figura 1 - *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass (Representante do gênero *Acmella*)
Fonte: SILVA & SANTOS, 2010

Ao realizar a revisão do gênero *Acmella*, baseado em análise filogenética dos caracteres morfológicos e citológicos, Jansen (1985) o considerou como independente, efetuando novas combinações da maioria das espécies de *Spilanthes*

a *Acmella*. Dessa forma, *Spilanthes* passou a ser composto por seis espécies, ao passo que *Acmella*, antes discutido como uma seção de *Spilanthes* é atualmente reconhecido como independente e circunscreve 30 espécies.

Para o Brasil, o mesmo autor assinalou a ocorrência de 10 espécies: *Acmella bellidioides* (Smith in Rees) R.K. Jansen, *A. brachyglossa* Cass., *A. ciliata* (Kunth) Cass., *A. decumbens* var. *decumbens* R.K. Jansen, *A. leptophylla* (DC.) R.K. Jansen, *A. oleracea* (L.) R.K. Jansen, *A. psilocarpa* R.K. Jansen, *A. pusilla* (Hooker & Arnott) R.K. Jansen, *A. serratifolia* R.K. Jansen e *A. uliginosa* (Sw.) Cass.

Na Amazônia brasileira, até a descoberta de *Acmella marajoensis* por Silva e Santos (2011), cinco espécies do gênero *Acmella* haviam sido citadas, *A. brachyglossa* Cass., *A. ciliata* (Kunth) Cass., *A. oppositifolia* R.K. Jansen *A. uliginosa* (Sw.) Cass e *A. oleracea* (L.) R.K. Jansen. (SILVA 2008; MONDIN *et al.* 2010)

2.2 A espécie *Acmella oleracea*

A espécie *A. oleracea* tem vários sinônimos. Em uma revisão dos gêneros *Spilanthes* e *Acmella* por Jansen (1985), as espécies *Spilanthes oleracea* L., *S. oleracea* Jacq. e *Spilanthes acmella* auct non Murr (L.). foram revistos para *A. oleracea* (L.)R. K. Jansen.



Figura 2 - *Acmella oleracea* (Jambu) obtido após coleta.
Fonte: Autora, 2014

É uma hortaliça de clima tropical de largo consumo na região Norte do Brasil, principalmente no Pará. Pertence à família Asteraceae, nativa da Amazônia (PIMENTEL, 1985). Exige clima quente e úmido, com temperaturas acima de 25°C. Não tolera secas e baixas temperaturas, tendo seu crescimento prejudicado abaixo de 20°C (BRASIL, 2010), com precipitação anual de cerca de 2.700 mm ao ano, evapotranspiração potencial de 1.455 mm, umidade relativa do ar 86% e 2.389 horas anuais de luz solar (VILLACHICA et al., 1996)

Oliveira et al (2014) relataram que esta espécie vegetal enquanto alimento pode se tornar nutricionalmente viável uma vez que possui teor aceitável de proteínas e fibras, além de sua composição química, o que leva a erva a ser utilizada também na medicina tradicional para o tratamento de vários males.

Popularmente essa espécie além de ser usada em pratos típicos da culinária paraense também é utilizada como planta medicinal. Segundo a sabedoria popular suas folhas e flores podem ser recomendadas para elaboração de infusões no tratamento de anemia, dor de dente e garganta, sendo sugerida como antibiótico e anestésico (RANZI, 2005).

De acordo com a literatura, *Acmella oleracea* tem sido usada tradicionalmente para o tratamento de dor de dente e apresenta um grande número de substâncias bioativas, conferindo à espécie propriedades tais como, antioxidante, anti-inflamatória (BOONEN et al., 2010; DIAS et al., 2011), diurética (RATNASOORIYA et al., 2004) também é usada na higiene oral (HEBBAR et al., 2004).

Todas as propriedades da planta são atribuídas a diferentes substâncias, dentre elas os ácidos graxos essenciais, principalmente o ácido linoleico, um ácido graxo ômega-6 insaturado presente na composição de ácidos graxos dos óleos fixos da planta (PHRUTIVORAPONGKUL *et al.*, 2008).

Entretanto, na sua maioria, as substâncias ativas são N-alcamidas, principalmente a N-isobutil-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamida. O espilantol é um composto multifacetado e não está disponível comercialmente (DIAS *et al.*, 2012; SINGH e CHATURVEDI, 2012). É o responsável pela sensação de pungência e de anestesia local quando as flores são mastigadas.

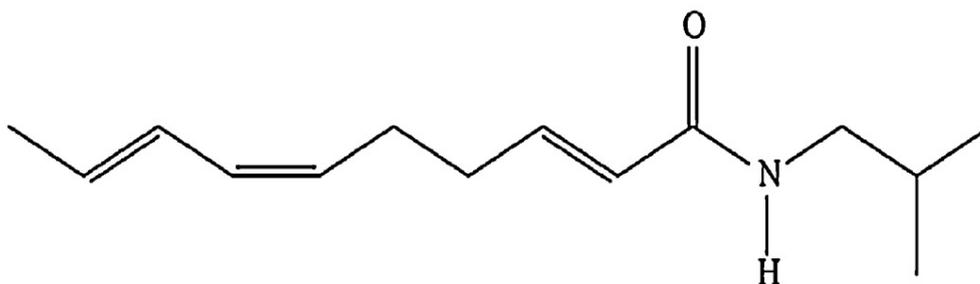


Figura 3 - Estrutura do espilantol: N isobutyl-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamida
Fonte: Abeyesiri *et al.*, 2013

As alcamidas são um grupo de metabólitos secundários encontrados em várias espécies vegetais, dentre elas as do gênero *Spilanthes* (*var. Acmella*). É um grupo de compostos constituído pela combinação de um ácido graxo com oito a dezoito átomos carbonos, geralmente alifática, e um grupo amino (CAVALCANTI, 2008).

A natureza dos resíduos ácidos (comprimento da cadeia carbônica, grau de insaturação, estereoquímica, etc) e das amins são características de cada gênero e servem como critério quimiotaxonômico. Tais substâncias são chamadas protoalcaloides ou pseudoalcaloides porque o átomo de nitrogênio não faz parte de um anel heterocíclico (RÍOS, 2012)

2.3 Técnicas hífenadas

Há duas décadas, Hirschfeld introduziu o termo “hífenadas” para se referir a combinação de técnicas de separação com uma ou mais técnicas de detecção espectroscópicas, em linha. Esta técnica permitiu articular técnicas de separação e de detecção espectroscópica, que nos dias de hoje é conhecida como técnica hífenada (JOSHI et al, 2012)

Esse termo tem sido mais frequentemente aplicado ao acoplamento da espectrometria de massas (EM) a cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC), e à combinação da cromatografia líquida com a ressonância magnética nuclear, CLAE RMN (KITE et al., 2003).

As técnicas a serem acopladas deverão gerar informações diferentes, ou seja, ser ortogonais. Um exemplo é o acoplamento de métodos eficientes de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG), com técnicas espectrométricas como espectrofotômetro de UV-Vis (DAD), espectrômetro de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN), que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra, funcionando como detectores (RODRIGUES et al, 2006).

Existem outros exemplos de detectores para a execução das técnicas hífenadas. O uso do detector por espalhamento de luz evaporativo (ELSD - Evaporative Light Scattering Detector) vem crescendo significativamente, mostrando que é uma valiosa técnica de detecção para análise de produtos naturais (URANO; RODRIGUES e BERLINCK, 2012).

2.3.1 CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA-ULTRAVIOLETA (HPLC-UV)

As técnicas cromatográficas estão entre as principais de separação, especialmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rio e outras. Isto se deve, principalmente, à sua capacidade de separação dos componentes presentes nas misturas em função da eficiência e do poder de resolução das colunas modernas (LANÇAS et al, 2009).

Para a caracterização e quantificação de marcadores químicos em amostras complexas a utilização desta técnica requer o uso de detectores (transdutores) apropriados, que aumentem a seletividade e a sensibilidade da análise das substâncias de interesse. Os detectores geralmente utilizados são: de absorção no UV e visível (UV-Vis), de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicos (SANTOS, 2010).

O desenvolvimento dos detectores UV-Vis (Ultravioleta – Visível) de comprimento de onda variável, baseados nos espectrofotômetros ao invés dos fotômetros, permitiu a obtenção dos espectros completos de um pico cromatográfico nesta região espectral (LENDIA, 2005).

Os espectrofotômetros de comprimentos de onda variável no UV-Vis cobrem a faixa de 190 a 880 nm através de monocromador, que seleciona o comprimento de onda desejado do feixe de luz emitido pelas lâmpadas de deutério (UV) ou Tungstênio (Vis). O sinal gerado é convertido, por um comparador logarítmico, em absorvância (A), que é proporcional a concentração (c) pela Lei de Lambert-Beer $A=\epsilon bc$ (COLLINS, 2006).

Os detectores espectrofotométricos por arranjo diodos (DAD) também são utilizados em análises de produtos naturais. Toda a luz da fonte passa pela cela do detector. A luz emergente é dispersada por uma grade holográfica, sendo os comprimentos de onda resultantes focalizados por uma fila de fotodiodos (de 256 até 1024), com isso, todos os espectros podem ser armazenados (COLLINS, 2006).

2.3.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - ESPECTROMETRIA DE MASSAS (HPLC-MS)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. Apesar de ser uma excelente técnica de separação, a HPLC necessita de uma técnica confirmatória quando a análise qualitativa (confirmação da identidade química) é também necessária. A Espectrometria de Massas é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias; o acoplamento entre estas duas técnicas dá origem a uma ferramenta analítica versátil e de grande

potencial na análise qualitativa e quantitativa: a CLAE-EM (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas) (LANÇAS,2009).

Dentre os acoplamentos, a HPLC-MS é muito mais seletiva e, em certas circunstâncias, mais sensível que HPLC-DAD. Já a identificação de compostos é mais difícil e nem sempre viável, por causa da menor resolução cromatográfica e a possível coeluição de compostos (RODRIGUES et al, 2006)

Para análise de produtos naturais, as interfaces mais utilizadas em HPLC-MS são: a ionização química à pressão atmosférica (IQPA), *electrospray* (IES) e *termospray* (TSP). No Brasil, a maioria dos instrumentos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa possui interface *electrospray* como fonte geradora de íons (ESPADA, et al. 2008; RODY, et al. 2007). Durante a ionização por nebulização eletrônica, três tipos de íons podem ser gerados: íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas (íons *quasi*-moleculares) e moléculas cationizadas ou anionizadas (CROTTI et al, 2006).

Na nebulização eletrônica (Figura 4), o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido (na fase móvel, no caso da CLAE) passa através de um capilar, a pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“spray”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) na região do “spray” (VÉKEY, 2001; ARDREY, 2003; SMERAGLIA; BALDREY; WATSON, 2002).

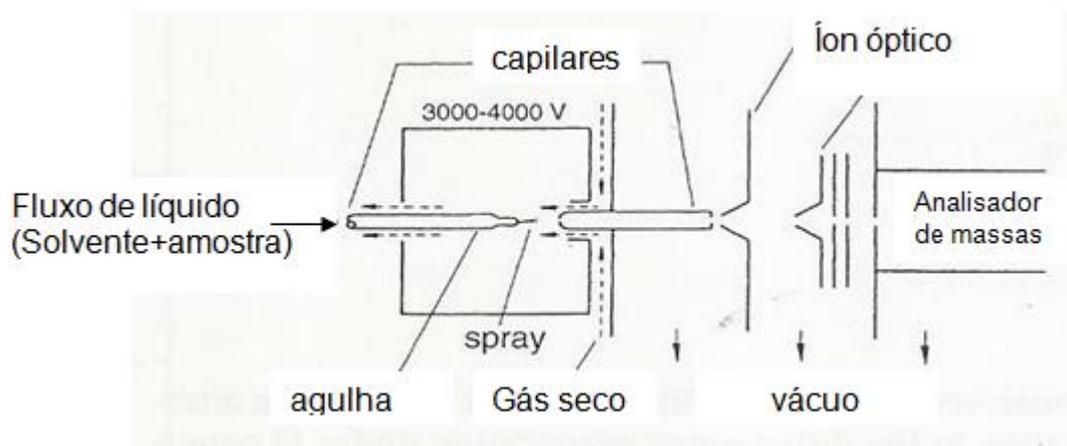


Figura 4 -Representação esquemática da fonte de ionização por nebulização eletrônica
Fonte: HESSE, 2008

À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito (Figura 5) a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (VÉKEY, 2001; ARDREY, 2003; SMERAGLIA; BALDREY; WATSON, 2002).

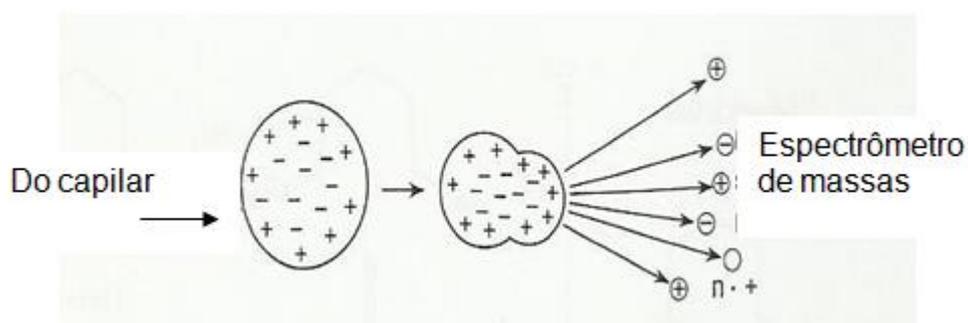


Figura 5 – Formação de íons em Eletrospray
Fonte: Hesse, 2008.

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver programações para análise de *Acmella oleracea* através de técnicas hífenadas.

3.1 Objetivos específicos

Determinar perfil fitoquímico por via úmida do extrato bruto de caule e folha;

Definir perfis de extratos e frações obtidas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD);

Identificar ou caracterizar substâncias presentes em extratos e frações obtidas por HPLC-UV-ELSD e UHPLC-DAD-MS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal de partida foi adquirido no município de Tailândia, estado do Pará, sítio Santa Inês na microrregião de Tomé-Açu as margens da rodovia PA150, posicionado a 260 Km da capital Belém, nas coordenadas 02°56'22" de latitude sul e 48°57'03" de longitude oeste, e consistia de 10 maços de *Acmella oleracea* (jambu) frescos, compostos de folhas, flor, raiz e caule.

4.2 Preparação da droga vegetal

O material vegetal foi higienizado com álcool etílico 70%, e separado em folhas, flor, caule e raiz para a trituração em processador Black & Decker, modelo SB60-BR. Após a obtenção da amostra triturada, procedeu-se à maceração por 7 dias com etanol a 92,8 °GL numa proporção de 1:10 sendo o material armazenado em frascos devidamente identificados para posterior utilização, de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010).

Os extratos etanólicos de cada parte da planta (EEAOFL;EEAOC;EEAOFO;EEAOR), foram filtrados e concentrados a baixa pressão. Um evaporador rotativo Buchi Rotavapor modelo R-210 foi utilizado para concentrar os extratos, que foram transferidos para frascos previamente tarados e levados à estufa modelo Medicate MD 1.2 para completar a evaporação do etanol, a 40 °C. Após o esfriamento dos frascos, o concentrado foi congelado e liofilizado.

4.3 Preparo de amostra

O extrato liofilizado de flor (EEAOFL) foi fracionado por partição sólido-líquido utilizando-se, respectivamente, diclorometano e metanol, solventes de polaridade crescente, de acordo com Barbosa et al 2012, dando origem as frações diclorometano (FLDCM) e metanólica (FLMEOH).

Os extratos de folha e caule foram reunidos (EEAFOC) a fim de se obter maior rendimento do material, este extrato e o de raiz (EEAOR) foram submetidos a um tratamento diferente de EEAOFL.

Pesou-se 20 mg de EEAFOC e EEAOR e solubilizou-se em 1 mL de metanol, em seguida as amostras foram submetidas a tratamento com ultrassom por 20 minutos e então filtradas em cartucho sílica SEP-PAK C18. A partir daí obtiveram-se as amostras FOCM (folha+caule fração metanólica), FOCAE (folha +caule fração acetato de etila), não foi necessário outro solvente para tratamento de EEAOR.

4.4 Abordagem fitoquímica por via úmida do extrato e frações

A abordagem por via úmida foi realizada em EEAOC e EEAFO antes da reunião dos extratos, para a detecção de metabólitos secundários. Os testes foram realizados segundo a técnica descrita em Barbosa et al (2012).

4.5 Determinação do perfil cromatográfico do extrato e frações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e técnicas hífenadas.

4.5.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para a análise por CCD foram utilizadas placas cromatográficas com gel de sílica de fase normal e de fase reversa e eluentes compostos pela combinação de diferentes solventes. Os cromatogramas obtidos foram observados sob luz visível e ultravioleta de comprimento de onda 254nm e 365nm e em seguida aspergidos com reativos apropriados, conforme as classes de metabólitos secundários investigadas.

O perfil cromatográfico de cada amostra foi obtido com base no fator de retenção dos constituintes químicos presentes.

O eluente utilizado para obtenção do perfil de extrato bruto foi diclorometano hidratado e para revelação com reagente de Dragendorff o eluente foi hexano/acetona 80:20.

4.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC-UV-ELSD)

O perfil cromatográfico de EEAOFL e FLMEOH foram determinados em Cromatógrafo Líquido modelo Agilent® 1260 Prep Pump com detector UV fixo, utilizando coluna ZORBAX XDB-C8 Analítica 4,6x 150 mm 5 micron, a análise foi realizada em modo gradiente, com 90% (Água) e 10% (ACN) durante 10 minutos, 60% (ACN) 40%(Água) de 11 a 38 minutos, retornando para a condição inicial até 40 minutos, fluxo 0,8 mL/min, volume de injeção 20µL e temperatura da coluna 26 °C e analisando os picos cromatográficos formados (tempo de retenção e espectro de absorção no ultravioleta). Em seguida a amostra foi analisada por ELSD (Detector por espalhamento de luz evaporativo - *Evaporative Light Scattering Detection* em inglês) com temperatura de nebulização e evaporação 50°C, para complementação dos resultados. Após análise deste perfil, a amostra FLMEOH foi novamente submetida a esta programação e picos em 5, 15 e 20 minutos foram coletados em coluna analítica, obtendo-se as frações FL05, FL15 e FL20 respectivamente.

4.5.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (UHPLC-ESI-MS)

Os extratos e frações de polaridade alta foram analisados na forma de solução em água e/ou solventes orgânicos, a fração FL20 foi submetida à secagem em temperatura ambiente e em seguida liofilização. As soluções foram posteriormente filtradas em microfiltro e analisadas por cromatógrafo líquido de ultra performance modelo Agilent 1260 com detector DAD acoplado ao espectrômetro de massas por ionização por eletrospray modelo Agilent G400 Triplo Quadrupolo com coluna ZORBAX XDB C8 2,1 x 50mm 3,5 micron de alta resolução, em modo gradiente linear iniciando com 98% (água pH 3 [Ácido Fórmico]) até 98%(ACN) com fluxos de 0,150 mL/min e 0,05 mL/min respectivamente.

A análise por UHPLC-MS foi realizada em 13 minutos no modo isocrático, com 60 % de acetonitrila e 40% de água, limite de pressão a 1,200 bar, fluxo 0,05 mL/min, volume de injeção 2 uL, termostato 20°C, temperatura da coluna 40 °C. A análise por ESI foi realizada em modo Full Scan, faixa de detecção de massas de 50 a 700, energia de colisão 50V, gás 300°C, fluxo de gás 5 l/min, nebulizador 45 psi

em modo positivo. As massas encontradas foram registradas no modo de ionização positivo e os espectros dos fragmentos obtidos foram elucidados de acordo com pesquisa na literatura.

Para análise de EEAOFOC e EEAOR foram desenvolvidas 10 programações, sendo que na programação de escolha duas colunas diferentes foram testadas em pH ácido e básico, porém o meio ácido foi o de escolha, por apresentar melhor resolução cromatográfica.

A programação que apresentou melhor perfil cromatográfico foi desenvolvida em 25 minutos, no modo gradiente, iniciando com 50 % etanol e 50% de água por 1 minuto, de 1 a 11 minutos 50% a 95% de etanol, de 11 a 15 minutos 95% de etanol e 5% de água, 15 a 20 minutos 95% a 50% de etanol, 20 a 25 minutos 50 % de etanol e 50% de água, limite de pressão 1200 bar, fluxo 0,4 mL/min, coluna Titan C18 2.1 cm x 7.5 mm 1.9 micra, volume de injeção 5 uL, termostato 20°C, temperatura da coluna 40°C. A análise de espectrometria de massas em modo Full Scan foi realizada por ESI em faixa de detecção de massas de 105 a 1000, energia de colisão 135 V, gás 300°C, fluxo de gás 5 l/min, nebulizador 45 psi. As massas encontradas foram registradas no modo de ionização positivo e os espectros dos fragmentos obtidos foram elucidados de acordo com pesquisa na literatura.

Em seguida, após a detecção do íon de interesse, as amostras foram submetidas a análise de Produto de íon (Product íon) para verificar a fragmentação do íon de interesse, nas mesmas condições da programação de escolha , porém com energia de colisão 70 V.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Abordagem Fitoquímica por via úmida.

Tabela 1 - Rendimento da extração das diferentes partes botânicas de *Acmella oleracea* com etanol 96° GL.

Parte da planta	Droga Vegetal (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)
Folhas (EEAOFO)	271,734	5,723	2,1
Raiz (EEAOR)	38,802	0,844	2,1
Caule (EEAOC)	688,518	9,040	1,3
Flores (EEAOFL)	46,406	1,192	2,5

Os extratos de EEAFO, EEAOC e EEAOFLL foram os que apresentaram maior rendimento, de acordo com a Tabela 1. Na segunda fase desta pesquisa estes extratos foram reunidos por apresentarem perfis cromatográficos semelhantes e para a obtenção de substâncias com melhor rendimento. Somente o EEAOFLL foi fracionado com diclorometano e metanol para a obtenção de extratos de média e alta polaridade.

A prospecção fitoquímica por via úmida de EEAOC e EEAFO permitiu caracterizar as classes de metabólitos secundários presentes na planta, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Classes metabólicas detectadas por via úmida em *Acmella oleracea*

Reativo	Classe	Caule	Folha
Água	Saponinas	+	+
Reativo de Pascová	Ácidos orgânicos	+	+
Reativo de Fehling	Açúcares redutores	-	-
Lugol	Polissacarídeos	-	-
Solução aquosa de Ninhidrina 1%	Proteínas e aminoácidos	-	-
Solução aquosa de FeCl ₃	Fenóis e taninos	-	+
HCl e Mg	Flavonoides	-	-
Reativo de Keede	Glicosídeos cardíacos	-	-
HCl e Solução aquosa de Vanilina 1%	Catequinas	-	-
Cloridrato de Hidroxilamina, solução metanólica de KOH e HCl	Sesquiterpenolactonas	-	-
CHCl ₃ e H ₂ SO ₄	Esteroides e triterpenos	+	+
Solução de p-dimetilaminobenzaldeído, CHCl ₃ e Éter de Petróleo	Azulenos	-	-
Tricloreto de Antimônio e CHCl ₃	Carotenoides	-	-
Solução de FeCl ₃ 1%	Depsídios	-	-
Solução de NaOH a 1N	Cumarina	-	-
Reativo de Bouchardat, Reativo de Dragendorff, Reativo de Mayer	Alcaloides	+	+
Solução de HCl 6N, H ₂ O ₂ concentrado e Solução de NH ₄ OH 6N.	Purinas	-	-

Os resultados descritos na Tabela 2 indicam a presença de saponinas, ácidos orgânicos, esteroides e triterpenoides e alcaloides nos extratos de caules e folhas, neste último houve detecção de fenóis e taninos além das outras classes mencionadas. Abeyesiri et al (2013), analisando os extratos de caule e folha, detectaram saponinas, alcaloides, taninos e flavonoides, resultado diferente deste trabalho quanto a presença de flavonoides e fenóis, os primeiros ausentes nas duas

partes analisadas e o último presente somente nas folhas. Esta diferença de constituintes químicos pode estar associada a diversos fatores bióticos e abióticos.

Segundo Maciel et al. (2002) essas divergências químicas podem ocorrer em decorrência de alguns fatores ambientais, tais como: umidade, radiação solar, vento, temperatura, herbivoria, poluição atmosférica e poluição do solo, fertilidade do solo, outros fatores como a idade da planta e época de coleta, também poderão causar modificações nos teores dos constituintes químicos de espécies vegetais.

Em uma pesquisa com *Acmella calva* (DC.) R.K.Jansen, Shanti (2010) relatou a presença de alcaloides, taninos e saponinas em todas as partes da planta, dados que corroboram o presente estudo, o autor ainda relaciona a presença das saponinas com potencial atividade antifúngica. Félix-Silva (2012), em um trabalho no Nordeste do Brasil também indicou a presença de fenóis, taninos e alcaloides no extrato das folhas de *Acmella oleracea*. A presença de alcaloides é constatada em praticamente todas as pesquisas que envolvem abordagem fitoquímica das espécies do gênero *Acmella*, a presença das alcaloides pode ser determinante para este resultado positivo, pela presença do nitrogênio em sua estrutura.

Muitos aspectos da biossíntese de Alcaloides continuam desconhecidos. Em Asteraceae, as alcaloides resultam da combinação de alquilaminas aparentemente derivadas após a descarboxilação de aminoácidos com ácidos graxos de cadeia curta e média derivado a rota dos policetídeos. (RAHMAN, 2014)

Borges (2013) também relata a presença de alcaloides nas folhas, porém relatou a presença de flavonoides, que como foi citado anteriormente não foi detectado no presente trabalho. Ferreira (2013) detectou triterpenoides e cumarina nessa espécie, não sendo especificado que parte da planta foi analisada, entretanto, vale ressaltar que a detecção dos triterpenoides corrobora a pesquisa atual.

Quanto aos triterpenoides, Prachayasittikul et al(2009) atribuiu a esta classe de metabólitos atividade vasorrelaxante, que foi comprovada por Wongsawatkul et al. em 2008, na ocasião os autores comprovaram que de 4 extratos testados (hexano, clorofórmio, acetato de etila, e metanol), o clorofórmico foi o que apresentou a mais alta atividade vasorrelaxante através da liberação parcial de NO e PGI₂ do endotélio, e essa atividade foi atribuída a presença de flavonoides, fenóis e os triterpenoides na planta. De acordo com Sharanabasappa et al., (2007) a

investigação preliminar de metabólitos secundários é importante para a estimativa quantitativa e localização dos metabólitos farmacologicamente ativos. Esta afirmação é consolidada por Shanti (2010) ao afirmar que posteriormente que, *Acmella oleracea* pode ser utilizada na preparação de drogas de uma forma sistemática, que pode levar a cura de muitas doenças no futuro, levando em consideração que *Acmella oleracea* tem várias atividades biológicas (Alcântara et al, 2015; Borges, 2012; Prachayasittikul et al, 2009; Shanti, 2010; Silva, 2012; Wongsawatkul et al, 2008) descritas na literatura e citadas neste trabalho.

5.2 Análise por Cromatografia em camada delgada

O melhor perfil por CCD para o extrato bruto foi obtido a partir de cromatograma desenvolvido com diclorometano hidratado (Figura 6; Figura 7; Figura 8). Para a detecção da alcanida utilizou-se hexano/acetona 80:20 e revelação com o reagente de Dragendorff (Figura 13.)

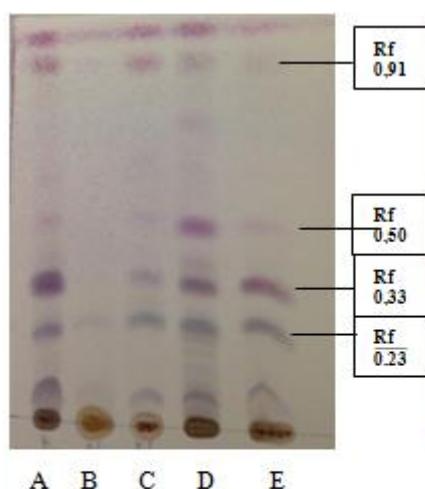


Figura 6 - Cromatograma Anisaldeído sob Luz Visível



Figura 7 - Cromatograma 254 nm



Figura 8 - Cromatograma 365 nm

Legenda: A- Raiz; B-Flor Aquoso; C- Flor Extrato Bruto; D- Folha; E-Caule.
Fonte: Autora 2014.

As amostras de EEAOR, EEAOF, EEAOC e EEAOFO, forneceram bandas com o mesmo Rf (0,23 cm; 0,33 cm; 0,50 cm e 0,91 cm), sob luz visível e luz UV no comprimento de onda de 254 nm e 365 nm, sendo que EEAOFO mostrou maior

número de bandas, pois neste órgão ocorre intenso metabolismo. Abeysiri, et al. (2013) realizaram a abordagem fitoquímica de extratos metanólicos de *Acmella oleracea* e observaram também o predomínio de bandas no extrato de folhas, em sistema eluente constituído de clorofórmio/diclorometano/ciclohexano/metanol na proporção de 5:4:1:0,4.

EEAOFL apresentou uma banda com $R_f = 0,50$ no eluente diclorometano hidratado sob luz visível e quando observado sob luz UV de 365nm, o mesmo relatado por Sushimita et al (2015) ao avaliar o extrato metanólico das flores de *Acmella oleracea* em sistema clorofórmio/metanol na proporção 70:30, o que caracteriza uma polaridade de eluente semelhante à utilizada neste trabalho, na oportunidade, o autor atribuiu este valor de R_f a presença de flavonoides no material analisado.

Ainda com relação à interpretação da análise por CCD observa-se a banda com $R_f = 0,33$, que conforme Wagner e Bladt (2001) permite sugerir tratar-se de compostos pouco polares como os presentes em óleos essenciais, tais como aldeídos, cetonas e ésteres terpênicos, pois o eluente utilizado tem baixa polaridade (diclorometano hidratado). De acordo com Lorenzi e Matos (2002), *Spilanthes oleracea* - Jambu - possui cerca de 0,7% de óleo essencial e Borges (2014) identificou mais de 60 substâncias contidas nele, sendo β -mirceno (Figura 9), dictamnol (Figura 10), germacreno D (Figura 11), β -pineno (Figura 12) as majoritárias.

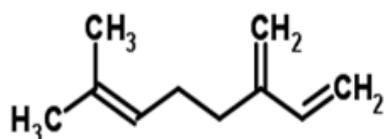
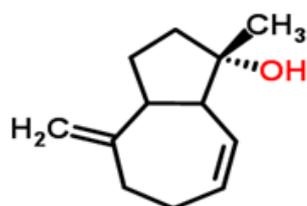
Figura 9 - β -mirceno

Figura 10 - dictamnol

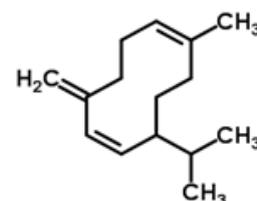
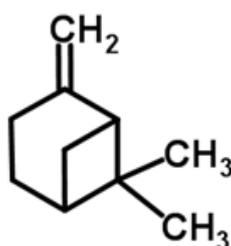


Figura 11 - germacreno D

Figura 12 - β -pineno

EEOFL foi analisado por CCD sobre gel de sílica de fase normal usando eluentes de diferentes polaridades, inclusive hexano/ acetona (80:20) e Reativo de Dragendorff como revelador (Figura 13) (Wagner & Bladt, 2001) para a prospecção de alcaloides e substâncias nitrogenadas.

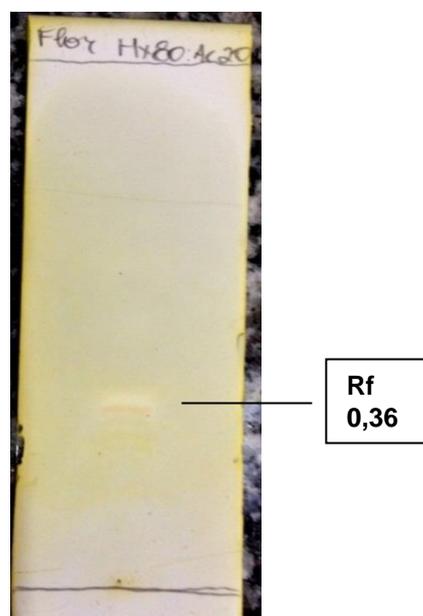


Figura 13 - Cromatograma EEOFL
Fonte: Autora, 2014

Após a revelação com Dragendorff, o cromatograma do extrato hidroetanólico de flor apresentou uma banda de cor alaranjada, com $R_f = 0,36$. Alcantara et al (2015) em um trabalho com avaliação farmacognóstica de *Acmella oleracea* obteve $R_f = 0,37$, semelhante ao aqui relatado, usando as mesmas condições cromatográficas. O reagente de Dragendorff é uma solução de $K(BiI_4)$ dissolvido em ácido, formando uma mancha de cor laranja ou laranja avermelhado quando em contato com alcaloides ou compostos nitrogenados em um cromatograma (DENNY et al, 2007). No caso de *Acmella oleracea*, os compostos nitrogenados que reagem com o Reativo de Dragendorff são as alcalmidas, que de acordo com Rahman (2014) são amidas naturais bioativas que possuem um resíduo de ácido graxo insaturado, aromático ou alifáticos ligado a um grupo amina alifática ou aromática (Figura 14).

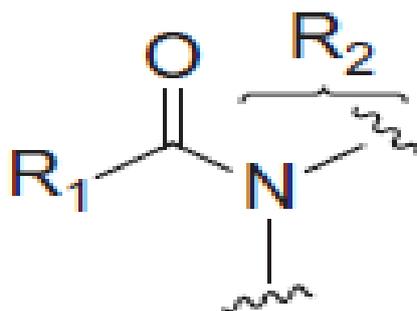


Figura 14 - Estrutura do grupo funcional das alcalmidas
Fonte: Rahman, 2014.

5.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV-ELSD)

O extrato bruto de flor (EEOFL) e sua fração metanólica (FLMEOH) foram analisados por HPLC em modo gradiente visando separar os componentes da amostra e caracterizá-los com relação à polaridade. Os cromatogramas foram registrados por detecção para luz ultravioleta nos comprimentos de onda: 200, 230, 275 e 365 nm, e também por ELSD.

A análise de EEOFL na concentração 10mg/mL, volume de injeção 20 μ L, forneceu os cromatogramas apresentados nas figuras 15,16, 17, 18 e 19.

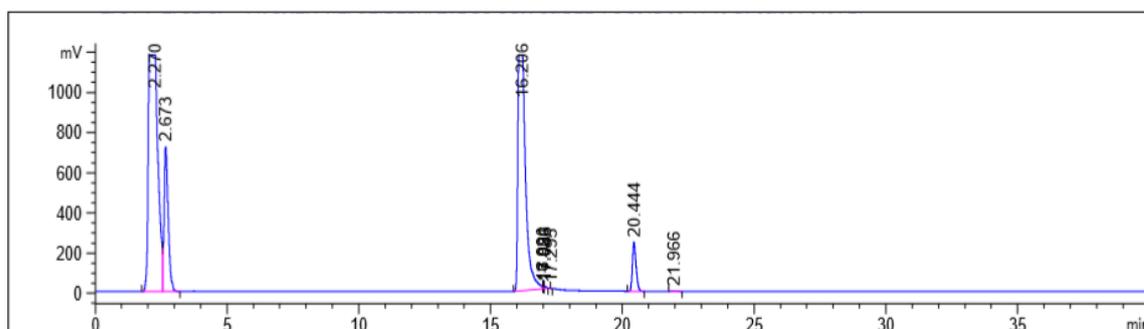


Figura 15 – Cromatograma de EEOFL obtido por espalhamento de luz evaporativo (ELSD)

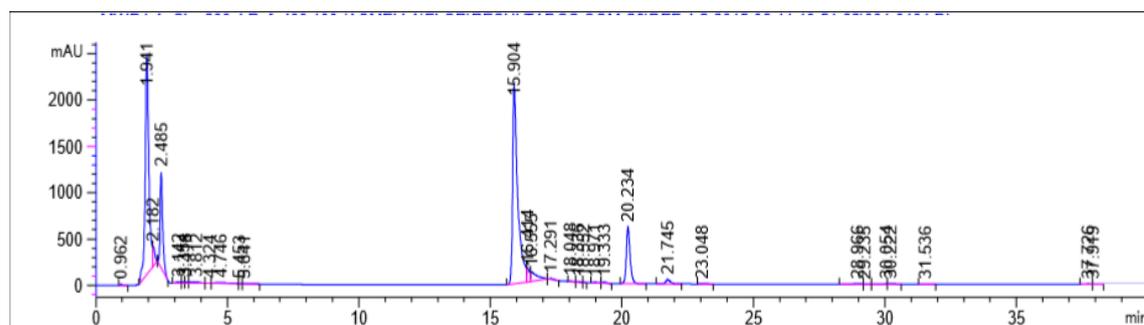


Figura 16 - Cromatograma de EEOFL registrado a 200 nm por HPLC-UV-ELSD.

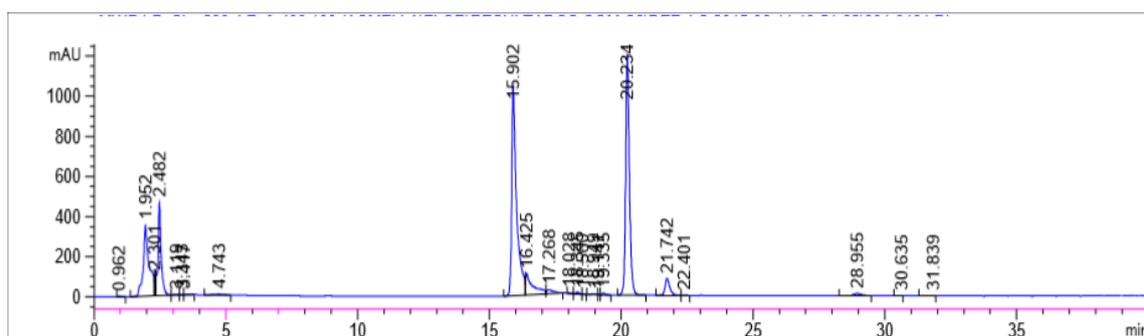


Figura 17 - Cromatograma de EEOFL registrado a 230 nm por HPLC-UV-ELSD.

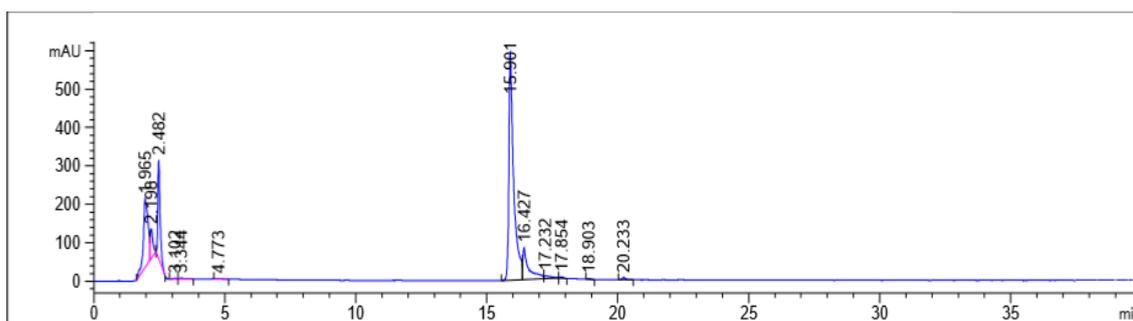


Figura 18 - Cromatograma de EEAOFL registrado a 275 nm por HPLC-UV-ELSD.

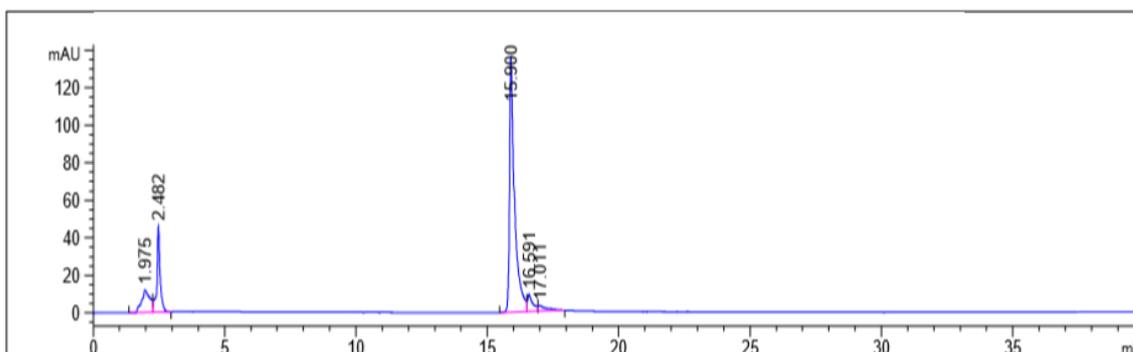


Figura 19 - Cromatograma de EEAOFL registrado a 365 nm por HPLC-UV-ELSD.

A análise por HPLC-UV-ELSD em coluna RP-8 foi a que forneceu o cromatograma do extrato bruto com melhor separação das bandas. Observam-se, nos perfis cromatográficos, picos relativos a substâncias de características mais polares, quando a proporção de água foi de 90% e que foram detectadas em todos os comprimentos de onda, assim como por ELSD; sendo as mais intensas observadas no cromatograma a 200 nm (Figura 16).

Foi observada a presença de um pico com TR em torno de 15 minutos, em todos os comprimentos analisados e também em ELSD, com mínimas diferenças nos valores de TR.

Um pico com TR= 20,23 (área 8,51 %) foi observado em 200 nm (Figura 16) e 230 nm (Figura 17), neste com maior intensidade (área 30,15 %). Provavelmente a mesma substância foi detectada por ELSD em TR= 20,44 (Figura 15).

A mesma programação desenvolvida na análise do extrato, foi aplicada para analisar FLMEOH, que foi analisada na concentração de 5 mg/mL e volume de injeção 20 μ L e monitorada nos comprimentos de onda 200, 230, 275 e 365 nm, além da análise por ELSD

A análise de FLMEOH por HPLC-UV-ELSD é apresentada nas figuras 20, 21, 22, 23 e 24.

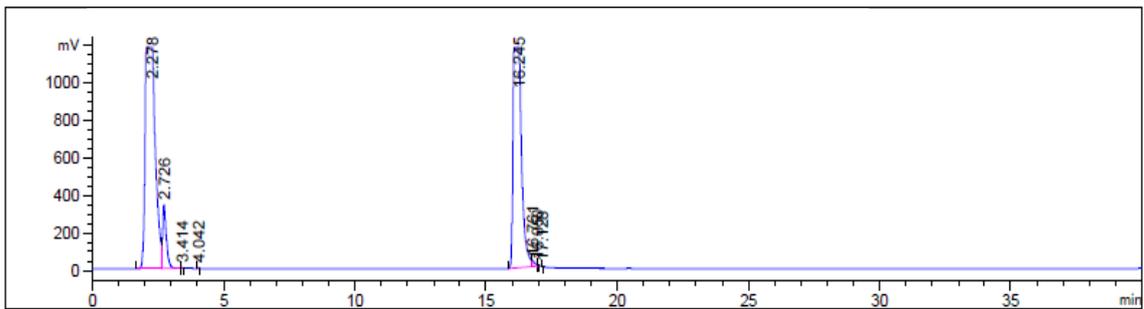


Figura 20 – Cromatograma de FLMEOH obtido por espalhamento de luz evaporativo (ELSD)

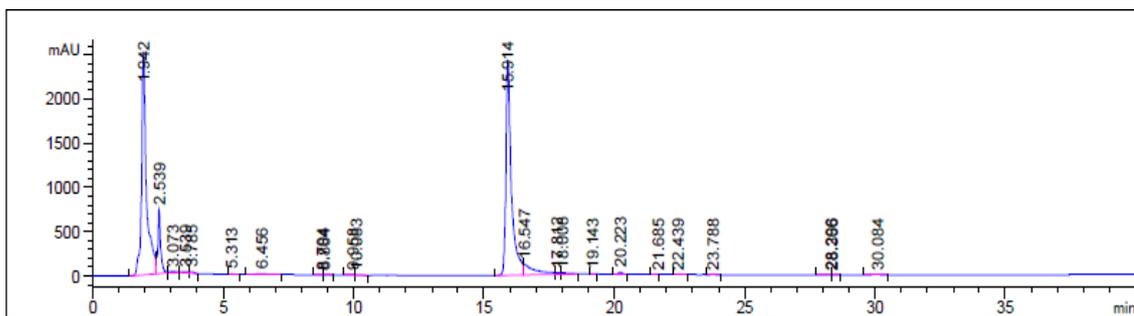


Figura 21 – Cromatograma de FLMEOH de flor registrado a 200 nm por HPLC-UV-ELSD

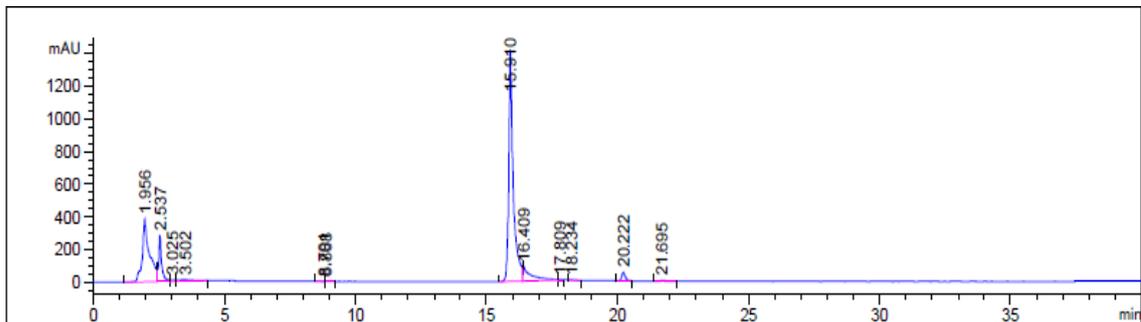


Figura 22 - Cromatograma de FLMEOH de registrado a 230 nm por HPLC-UV-ELSD

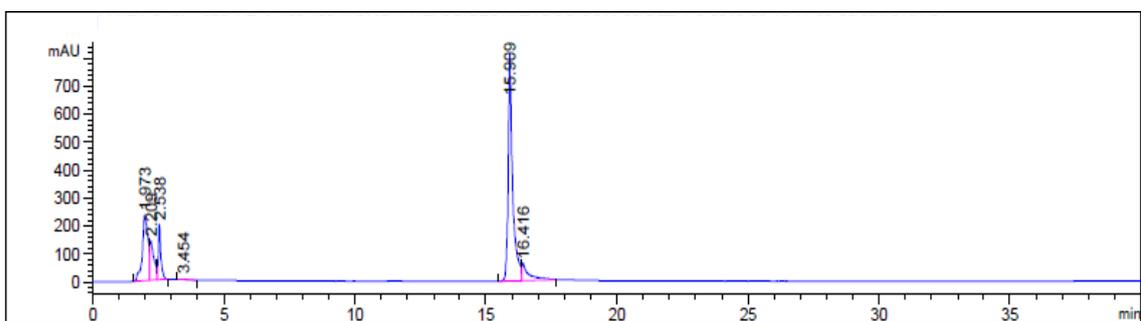


Figura 23 - Cromatograma de FLMEOH registrado a 275 nm por HPLC-UV-ELSD

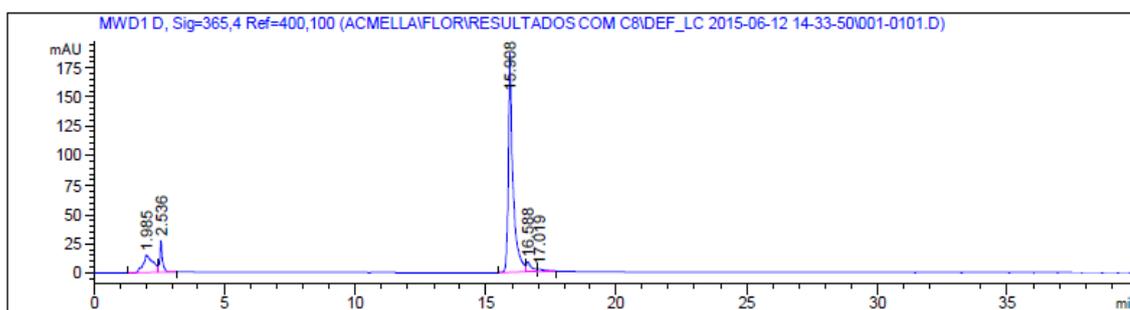


Figura 24 – Cromatograma de FLMEOH registrado a 365 nm por HPLC-UV-ELSD.

A análise FLMEOH também foi realizada sobre fase estacionária RP8. Observou-se nesta fração um perfil muito semelhante ao do extrato bruto, com substâncias mais polares no início do cromatograma, em todos os comprimentos de onda usados para monitorar a análise e em ELSD.

O pico em torno de 15 minutos observado no extrato bruto também foi observado nesta fração, sendo mais intenso a 200 nm (Figura 21), com TR= 15,91 e área 44,33% e em 230 nm (Figura 22) com TR= 15,91 e área 57,05%. Os cromatogramas em 200 nm e 230 nm também apresentaram picos com Rt= 20,22 e 20,22 respectivamente, esses picos também foram observadas no extrato, porém nesta fração a intensidade foi menor.

Após análise de FLMEOH, os picos registrados no início dos cromatogramas, em torno de 15 e 20 minutos, foram coletados da coluna analítica RP8 e em vials estéreis para posterior análise em UHPLC-MS

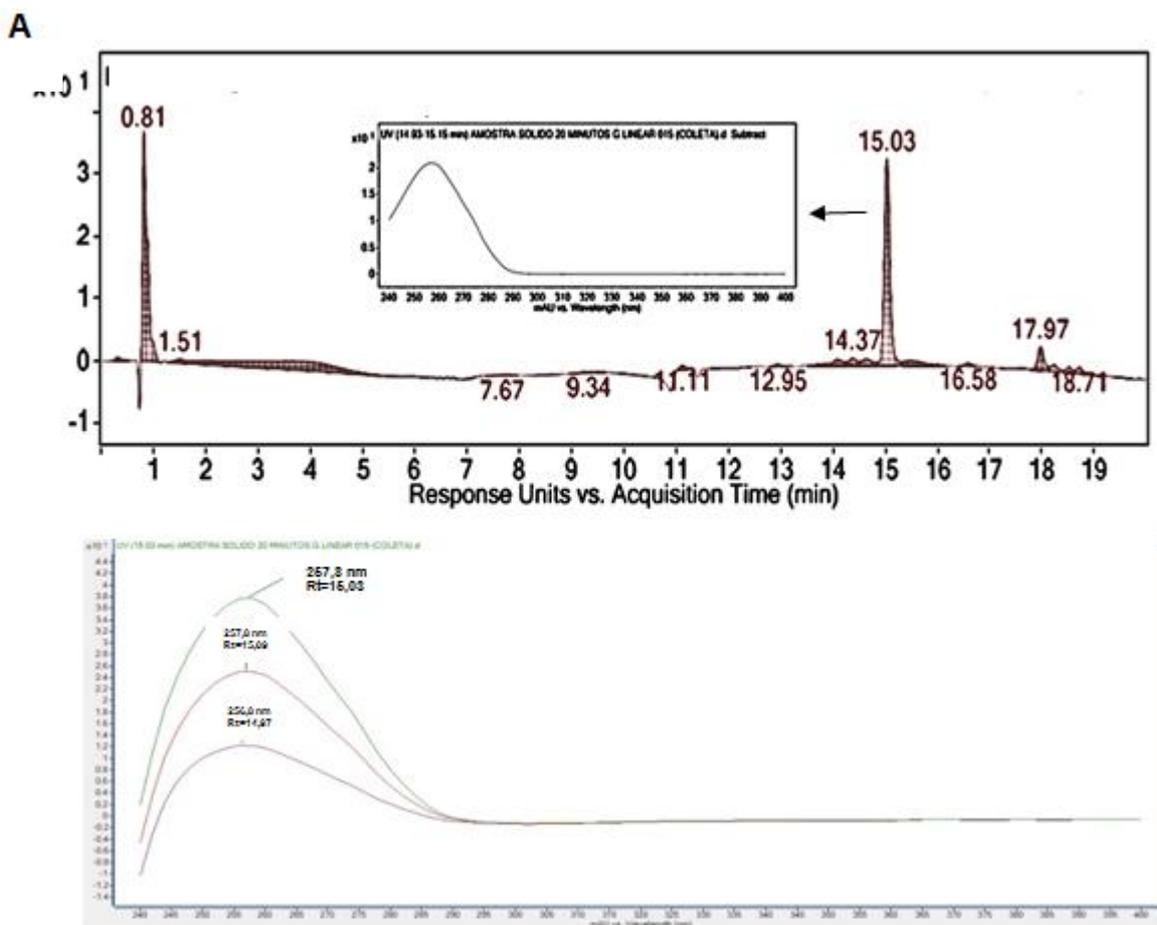
Quanto as análises por HPLC, Santos (2010) desenvolveu uma programação por HPLC-DAD para detectar espilantol em *Spilanthes acmella* utilizando detecção em 200, 230, 240 e 254 nm, porém utilizou condições cromatográficas diferentes deste trabalho.

Wongsawatkul et al (2008) encontraram picos no extrato metanólico de *Spilanthes acmella*, os quais foram relacionados a atividade vasorrelaxante, que era o objetivo do estudo, porém não realizaram testes para elucidação estrutural. Em 2010, Bae et al isolaram do extrato etanólico de *Spilanthes acmella*, espilantol e outras 7 alcaloides por HPLC

5.4 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC-DAD)

As frações FL05, FL15 e FL20, coletadas na análise anterior de FLMEOH foram submetidas a análise em UHPLC-DAD, buscando melhor resolução do cromatograma e obtenção de espectro no ultravioleta. Somente a fração FL20 forneceu resultado mais conclusivo, as outras três frações demandam mais experimentos para elucidação.

Foram realizadas várias análises em gradiente linear e isocrático, com fluxos de 0,150 mL / min e 0,05 mL/min e monitoramento em 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 e 365 nm. Durante as análises em ambos os fluxos utilizados, observou-se um pico a 15,03 minutos que apresenta espectro com máximo de absorção em 257 nm.



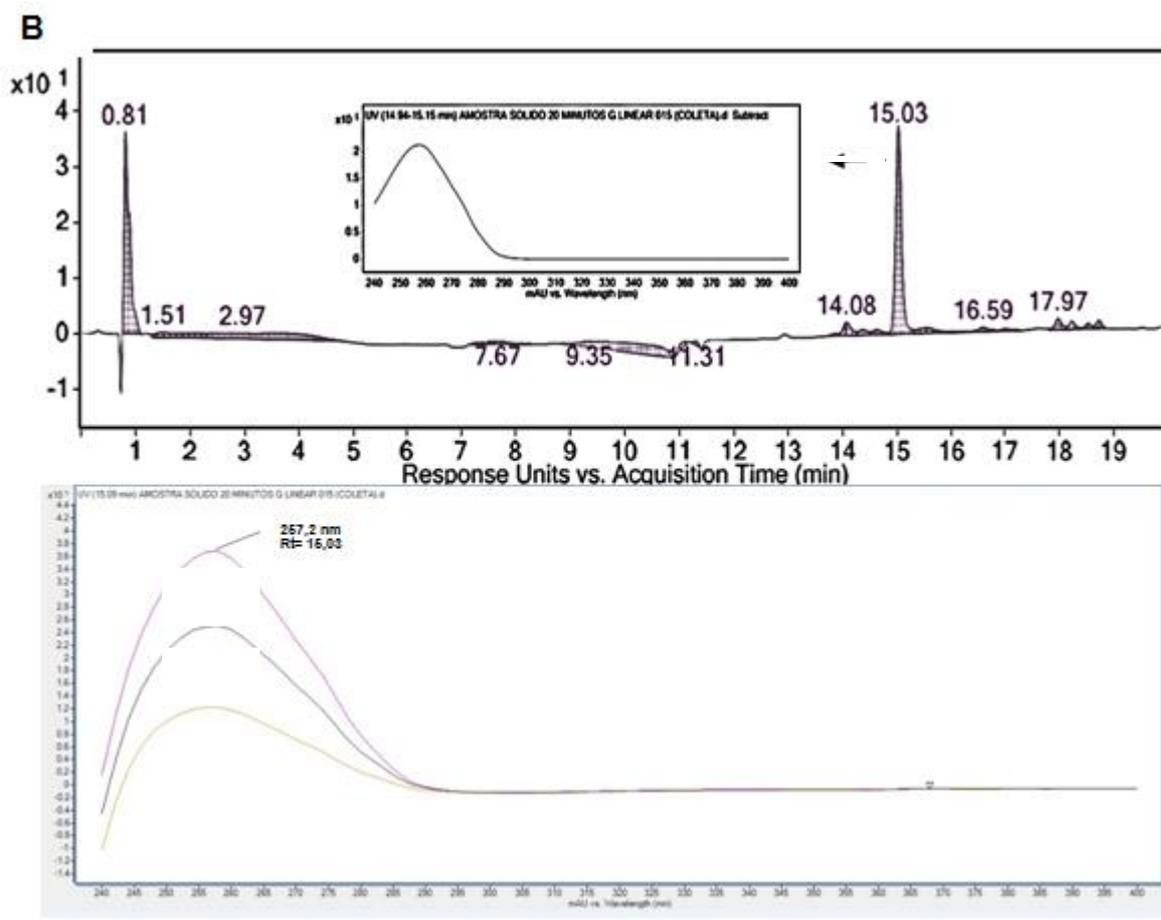
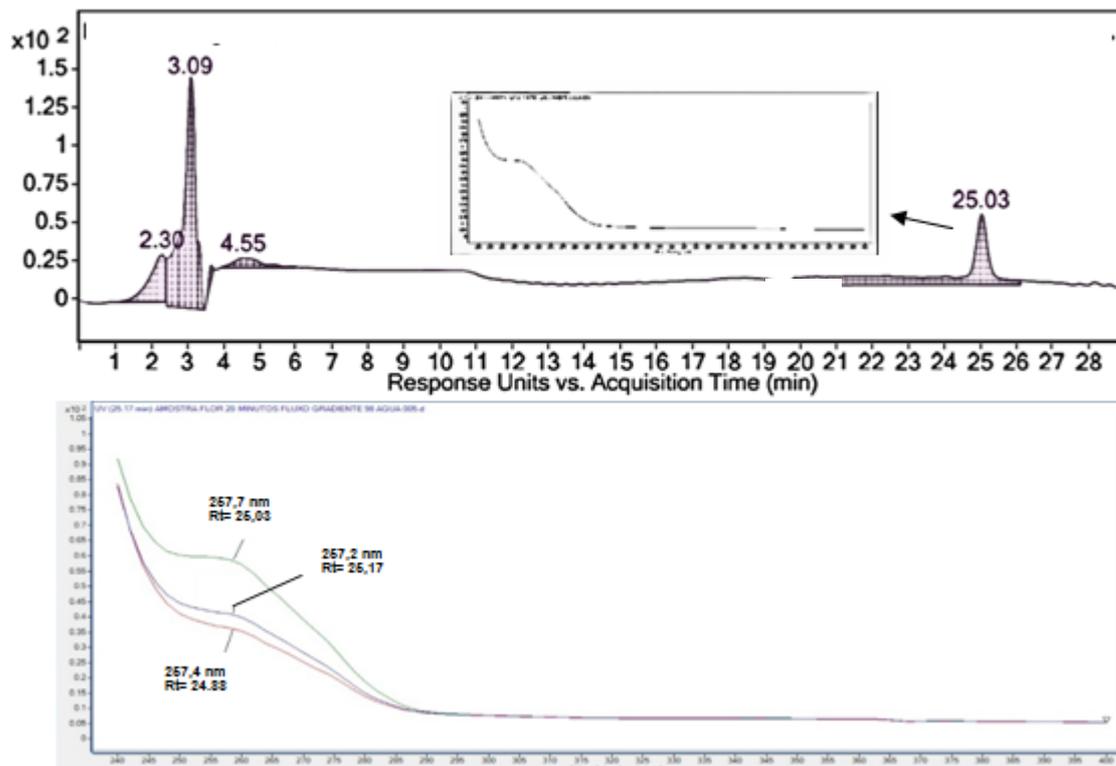


Figura 25 – Cromatogramas de FL20 registrados por UHPLC-DAD a 250 nm (A) e 260 nm (B) em modo gradiente linear 98% de água a pH 3 (ácido fórmico) a 98% de ACN, fluxo 0,150 mL/min.

Na figura 25, observa-se a formação do pico com TR=15,03 em 250nm (A) e 260nm (B) relativo ao espectro de absorção no ultravioleta com λ máximo de 257nm. Foi utilizado gradiente linear iniciando em 98% de água a pH 3 (ácido fórmico) e finalizando em 98% de acetonitrila com fluxo 0,150 mL/min no tempo de 20 minutos. A análise em gradiente linear inverso, iniciando em 98% de solvente orgânico, foi realizada, mas não apresentou um perfil que permitisse conclusões mais úteis. Abaixo dos cromatogramas, é apresentada a sobreposição dos espectros de 3 tempos diferentes para o pico com TR=15,03.

26 a.



26 b.

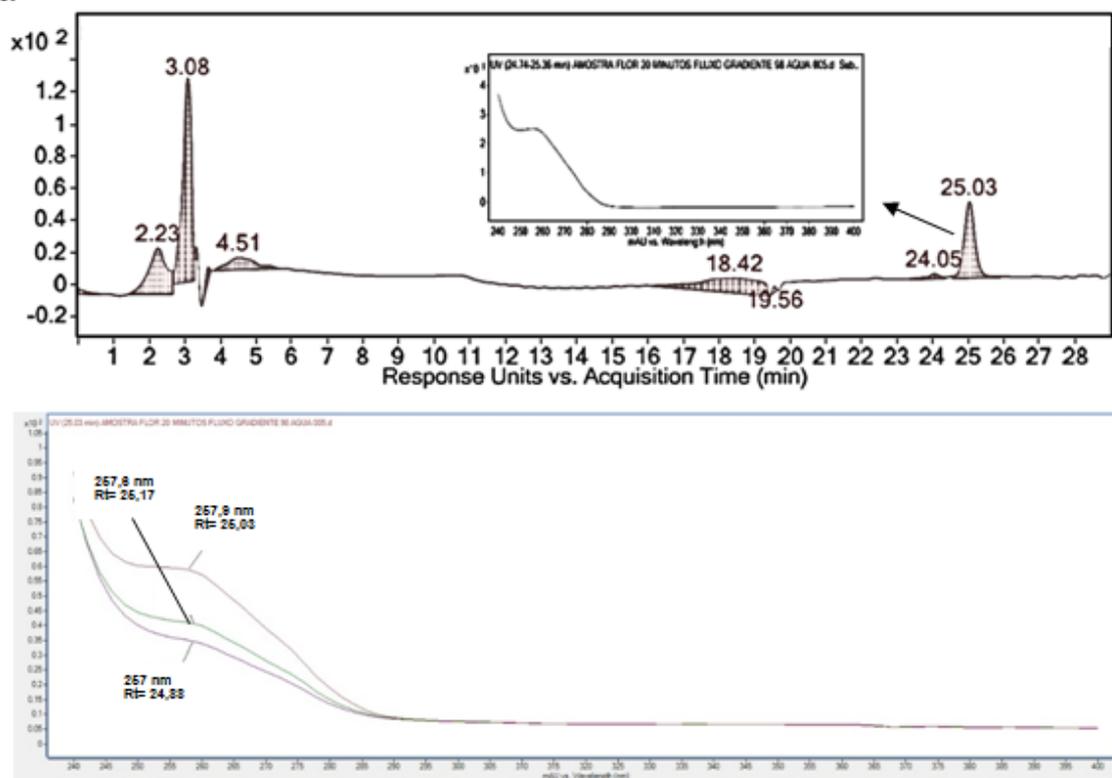


Figura 26 – Cromatogramas de FL20 registrados por UHPLC-DAD a 250 (26a) e 260 nm (26b) em modo gradiente linear 98% de água a pH 3 (ácido fórmico) a 98% de ACN com fluxo 0,05 mL/min.

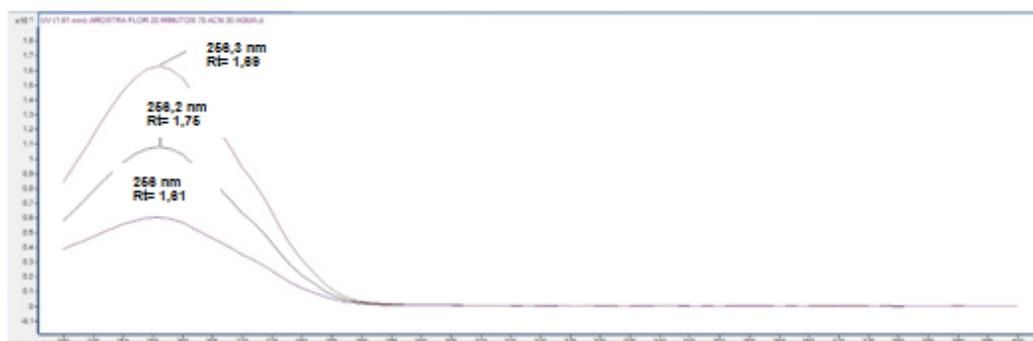
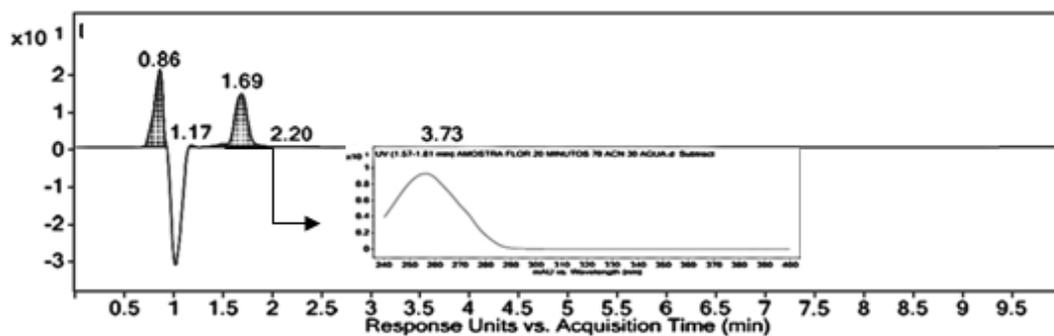
A figura 26 apresenta dois cromatogramas obtidos a 0,05 mL/min por 30 minutos. Observou-se a ocorrência de um pico com TR= 25,03 em ambos os

comprimentos de onda monitorados, sendo que o detectado em 250 nm (26a) apresentou a maior área com 71,59%. Abaixo dos cromatogramas observa-se a sobreposição dos espectros em 3 tempos diferentes do pico registrado.

As análises em fluxos diferentes mostram variação no tempo de retenção do pico que absorve em 257nm. Porto (2014) afirma que em cromatografia líquida, as variações no tempo de retenção podem ser devidas à influência de vários fatores, dentre eles o fluxo de trabalho, ainda ressalta que a variação do fluxo é diretamente proporcional à pressão aplicada no sistema, por isso, quando se aumenta o fluxo, a pressão no sistema é muito maior, logo a amostra vai passar através do detector mais cedo do que quando se aplicam as condições de fluxo do método original.

Neste trabalho, foram realizadas análises em modo isocrático com os fluxos de 0,150 mL/min e 0,05 mL/min para avaliar o comportamento dos constituintes da fração de 20 minutos, a melhor análise foi a realizada na proporção 70:30 (ACN/água pH 3 ácido fórmico), com monitoramento a 250, 260 e 270 nm, onde é possível visualizar o pico com TR=1,69 e λ máximo de 256 nm no ultravioleta, abaixo (Figura 27 -A) observa-se a sobreposição de 3 pontos da banda.

A



B

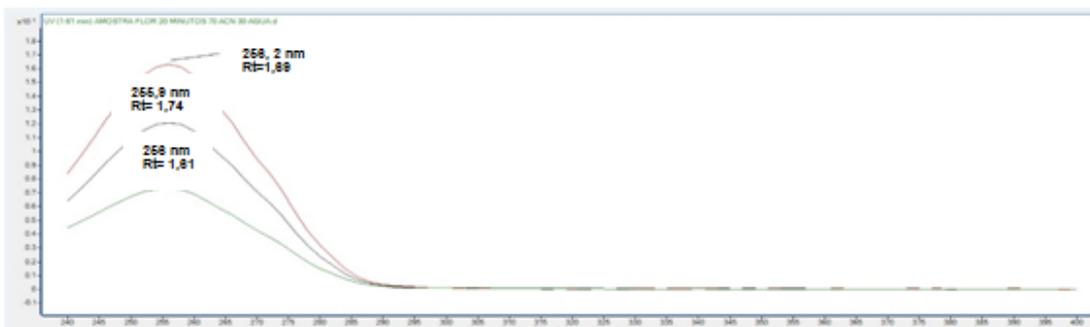
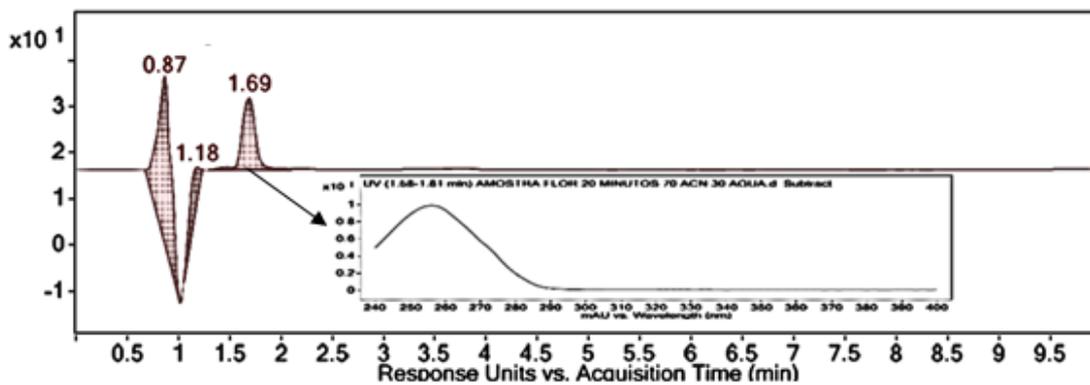


Figura 27 – Cromatogramas de FL20 registrados em UHPLC-DAD a 250 nm (A) e 260 nm (B) em modo isocrático 70:30 (ACN/água pH 3 ácido fórmico), fluxo 0,150 mL/min.

A figura 27 apresenta dois cromatogramas obtidos em modo isocrático, em 10 minutos de análise com fluxo 0,150 mL/min. Observou-se um pico com absorção máxima a 256 nm no ultravioleta com o mesmo Rt em ambos os comprimentos monitorados. O pico do cromatograma de 250 nm (A) é a que apresenta a maior área (100%) e as áreas dos outros picos são calculadas com relação a banda de maior área. Abaixo do cromatograma, a sobreposição de espectros registrados no ultravioleta do pico com TR=1,69.

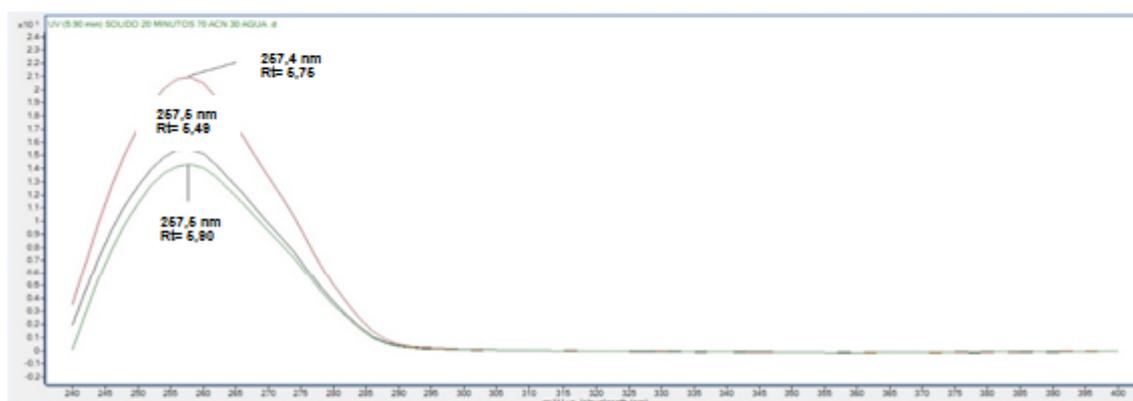
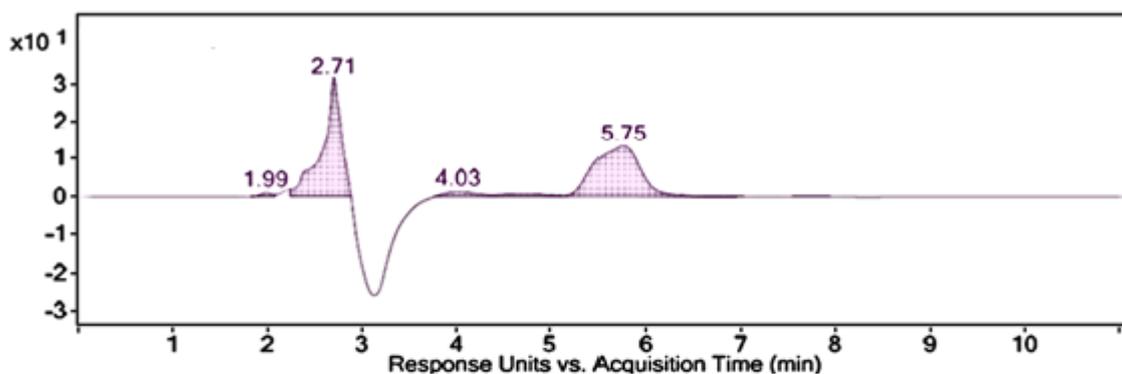


Figura 28- Cromatograma de FL20 registrado em UHPLC-DAD a 270 nm em modo isocrático 70:30 (ACN/água pH 3 ácido fórmico), fluxo 0,05 mL/min.

A figura 28 apresenta cromatograma obtido em modo isocrático (70:30 ACN: água pH 3 [ácido fórmico]) com fluxo 0,05 mL/min, observa-se que o pico que absorve em 257 nm teve o TR retardado em relação a análise anterior, provavelmente pela redução do fluxo, pois os outros parâmetros de análise foram preservados. Apesar de a banda apresentar-se larga com relação aos cromatogramas anteriores, o espectro é o mesmo em todos os tempos do pico, como é observado na sobreposição dos espectros obtidos no ultravioleta de 3

pontos, o que sugere a ocorrência do mesmo cromóforo em estruturas moleculares diferentes.

Quanto ao máximo de absorção em 256nm e 257 nm é possível sugerir a presença de composto aromático ou mais de um semelhante (isômeros), de acordo com McMurry (2011) compostos que absorvem na faixa de 256 nm apresentam a molécula conjugada 1,3-cicloexadieno, que pode ter um ou mais substituintes.

5.5 Análise por Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas (UHPLC-DAD-EM)

FL20 também foi analisada por UHPLC-ESI-MS em modo de ionização positivo e negativo, porém a qualidade do cromatograma de íons totais (TIC em inglês), obtido no modo de ionização positiva apresenta resolução melhor do que a do modo negativo. Nele observa-se o pico registrado a 2,64 minutos no TIC, com 22,76 % de área e cujo espectro de massas é apresentado na figura 29.

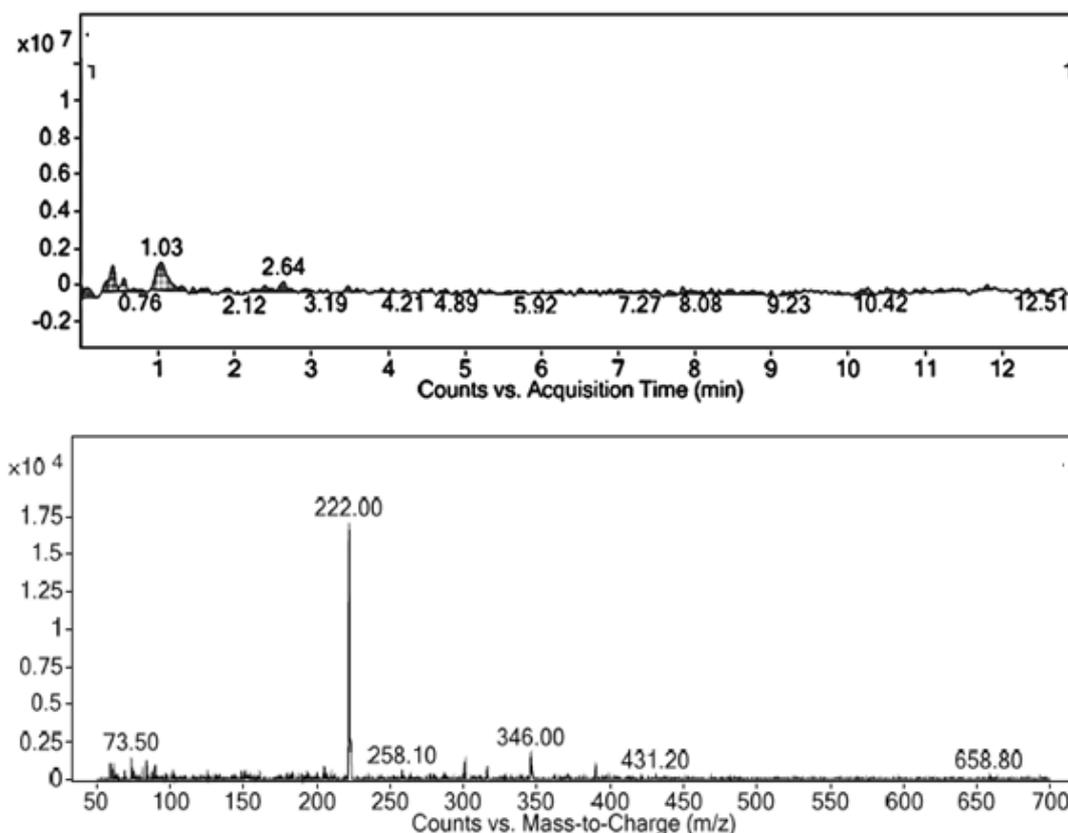


Figura 29-Cromatograma de íons totais de FL20 (TIC em inglês) e espectro de massas obtido em modo Scan por UHPLC-DAD-ESI-MS.

Na análise do espectro de massas do pico com TR=2,64 min observa-se sinal relativo ao fragmento $m/z=222$ (pico base), que de acordo com a literatura corresponde ao espilantol (BAE et al, 2010). O Cromatograma de Íon Extraído (EIC em inglês) (Figura 30) foi analisado para verificar o tempo de retenção exato do pico cromatográfico correspondente ao espilantol, nele observa-se que o pico base $m/z=222$ foi eluído em 2,61 minutos.

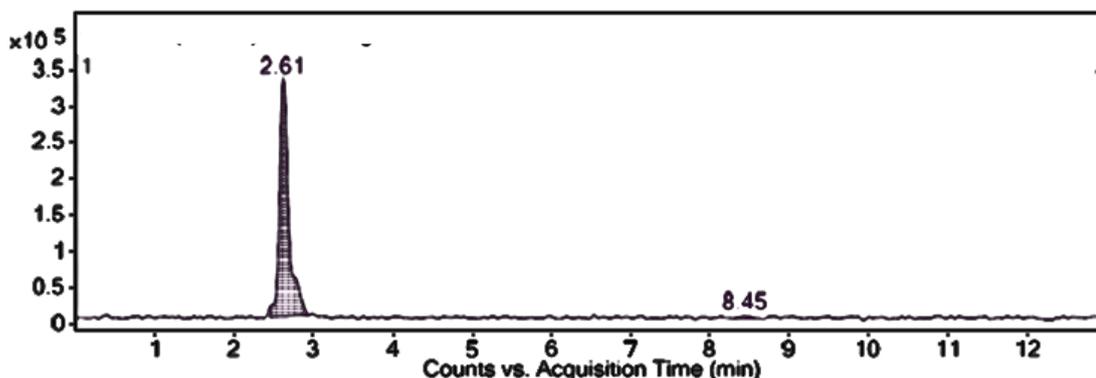


Figura 30 – Cromatograma de Íon Extraído (EIC em inglês) de FL20, modo isocrático 60 % acetonitrila 40% água, fluxo 0,05 mL/min.

Após a análise de FL20, as amostras FOCM (Folha+Caule fração metanólica) e RM (Raiz fração metanólica) foram também analisadas por UHPLC-DAD-ESI-EM, em modo de ionização positivo, como pode ser observado nas figuras 31, 32 e 33.

A figura 31 apresenta o TIC de FOCM, nele observa-se o pico registrado em 4,01 minutos, com 25,63 % de área e cujo espectro de massas é apresentado abaixo do cromatograma.

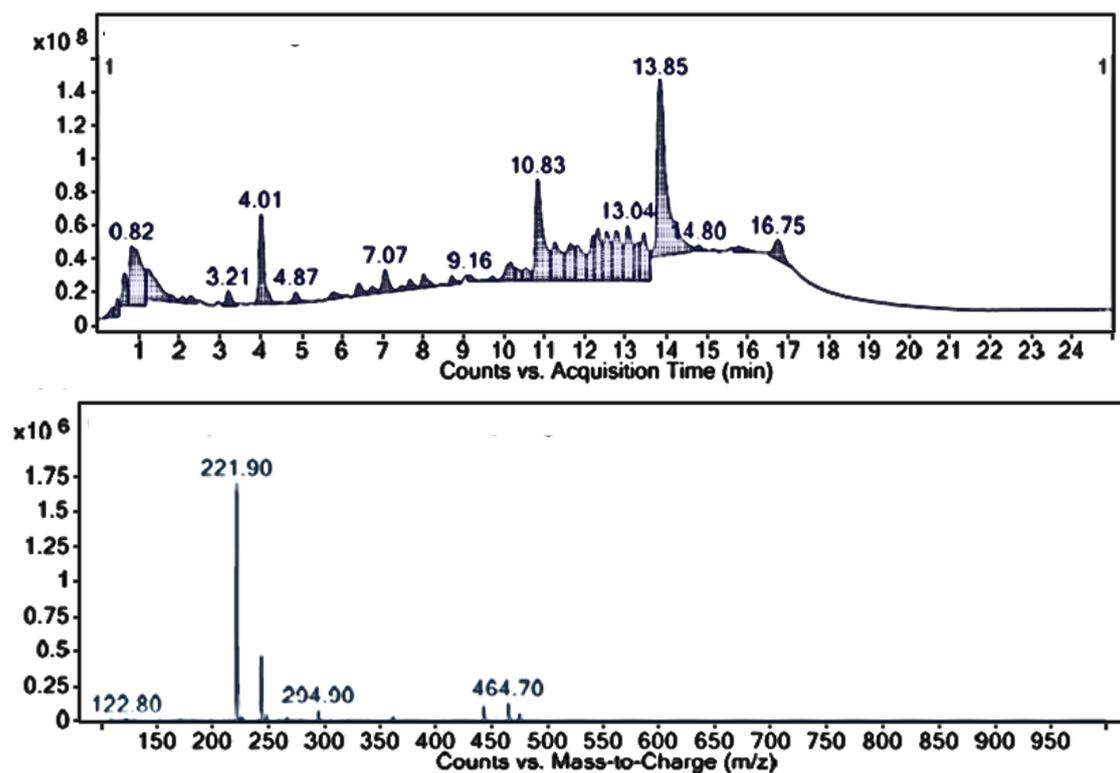


Figura 31- Cromatograma de íons totais (TIC em inglês) e espectro de massas de FOCM obtidos em modo positivo, Scan, por UHPLC-DAD-ESI-MS.

Ao analisar o espectro de massas obtido no modo Full Scan, observa-se o íon molecular 221.9, correspondente ao epilantol de acordo com a literatura (Barbosa et al. 2015). A figura 32 apresenta o perfil cromatográfico de FOCM em 260 nm, com a ocorrência de um pico com TR=3,92 e abaixo o perfil no ultravioleta com absorção máxima em aproximadamente 235 nm.

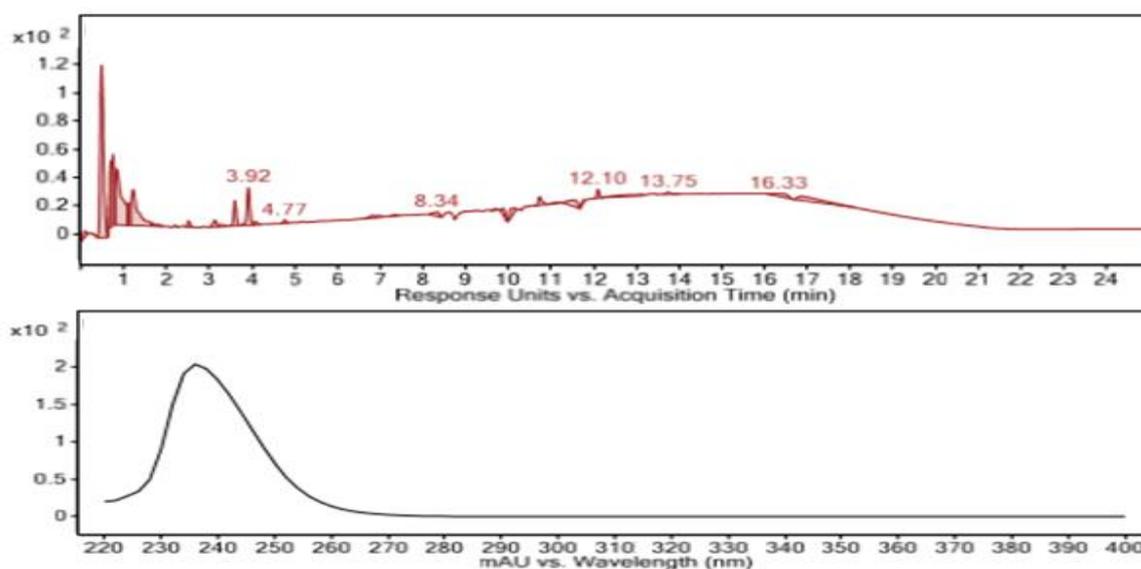


Figura 32- Cromatograma em 260 nm e espectro no ultravioleta de FOCM obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo gradiente com 50 % etanol e 50% de água por 1 minuto, 1 a 11 minutos 50% a 95% de etanol, 11 a 15 minutos 95% de etanol e 5% de água, 15 a 20 minutos 95% a 50% de etanol, 20 a 25 minutos 50 % de etanol e 50% de água, fluxo 0,4 mL/min.

A figura 33 apresenta o TIC obtido em coluna C18, modo Full Scan, após análise de RM, onde observa-se mais uma vez a presença do espilantol, detectado por ESI –MS, com pico eluído em 4,10 minutos no TIC e espectro de massas com o pico do íon molecular m/z 221.9 correspondente ao pico com TR=4,10, não sendo detectados sinais no UV.

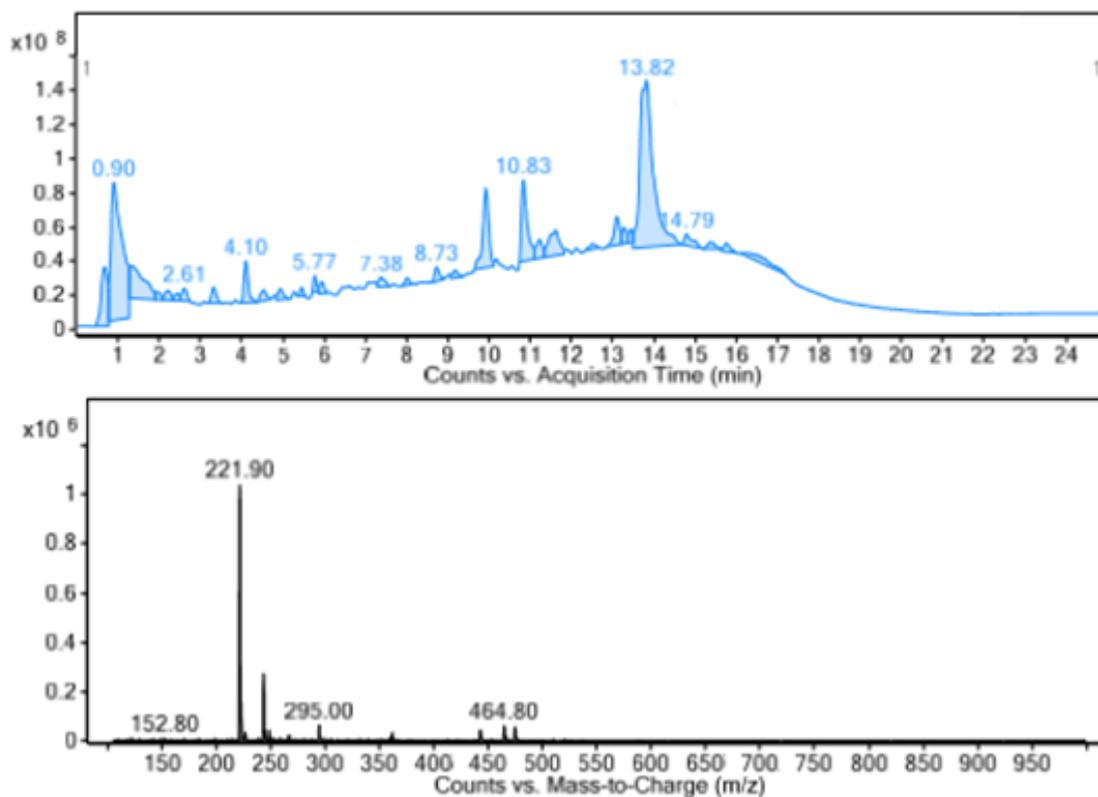


Figura 33- Cromatograma de íons totais e espectro de massas de RM obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo gradiente com 50 % etanol e 50% de água por 1 minuto, 1 a 11 minutos 50% a 95% de etanol, 11 a 15 minutos 95% de etanol e 5% de água, 15 a 20 minutos 95% a 50% de etanol, 20 a 25 minutos 50 % de etanol e 50% de água, fluxo 0,4 mL/min

Na literatura, as substâncias mais estudadas e conhecidas em *Acmella oleracea* e no gênero *Acmella* são as alcanidas, sendo o espilantol o que dispõe de mais dados. Boonen et al (2010) identificaram espilantol de *Spilanthus acmella* em 237 nm, o objetivo dos autores era testar uma formulação tópica a base da substância. Singh e Chatuverdi (2012) também monitoraram espilantol em 237 nm, e em 2010 os mesmos autores encontraram escopoletina em 346 nm, esta substância é uma cumarina conhecida por exibir atividades biológicas importantes, tais como: antioxidante, inibidor da enzima acetilcolinesterase e antileucêmica (MUSA, COPERWOOD E KHAN, 2008).

Spelman et al (2011) monitoraram espilantol também em 237 nm e em outra condição cromatográfica para atividade antimalárica em todas as partes da planta. Nomura et al (2013) avaliou o potencial terapêutico das alcanidas do extrato etanólico e frações de flores de *Acmella oleracea* e detectou em 259 nm a [(2E,4Z)-N-isobutil-2,4 undecadieno-8,10-diinamida], em 233 nm [(2E,6Z,8E)-Nisobutil-2,6,8-decatrienamida) (espilantol), em 261 nm [(2E,6Z,8E)-N-(2-metilbutil)-2,6,8-decatrienamida)]. Em 2010, Santos afirmou que a alcanida espilantol apresenta o máximo de absorção em 230 nm, registrado por HPLC-DAD na quantificação desta substância.

Ainda sobre a investigação do espilantol, este se dá em maior parte nos extratos hexânicos e metanólicos. Sharma et al. (2011); Dias et al. (2012) e Singh e Chaturvedi (2012) afirmam que, como as outras alcanidas, o espilantol tem caráter anfifílico, com grupo amida relativamente polar e a cadeia carbônica menos polar. Os ácidos graxos e seus derivados podem ser extraídos usando-se etanol, metanol, CO₂ supercrítico ou hexano. Mbeunkui et al (2011) afirma que o solvente de escolha para extração de alcanidas é o metanol, pois demonstra maior habilidade de quebra na interação amida-amida comparado ao hexano, na oportunidade os autores monitoraram em 254 nm alcanidas das flores de Jambu para atividade antiplasmódica. Neste trabalho, as frações metanólicas foram as que apresentaram melhor resolução cromatográfica com relação a detecção do espilantol.

A literatura recente discute os pontos específicos de fragmentação, mas não como acontece a ionização do espilantol, o que é muito importante, pois pode influenciar na fragmentação. Neste trabalho, uma análise de Produto de íon (Product íon em inglês) foi realizada para verificar a fragmentação da substancia em questão em FOCM e RM

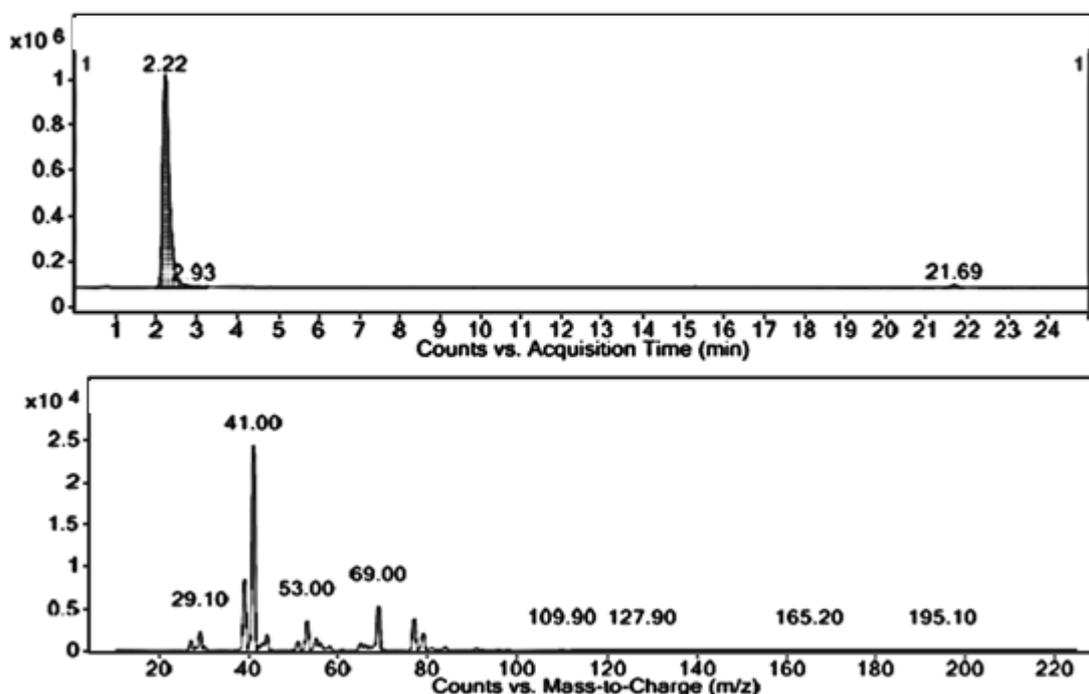


Figura 34 –TIC referente ao m/z 222 com espectro de fragmentação de FOCM obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo positivo, Product Ion.

Observa-se na figura 34 o TIC referente à análise de Produto de íon da amostra FOCM, pico com TR= 2,22 com área 11046893, equivalente a 100% e embaixo o espectro de massas referente a fragmentação com energia de colisão 70 V.

A figura 35 apresenta os resultados da fragmentação da amostra FOCAE, com um pico eluído em 2,11 minutos, e abaixo do TIC, o espectro de massas com energia de colisão 70 V.

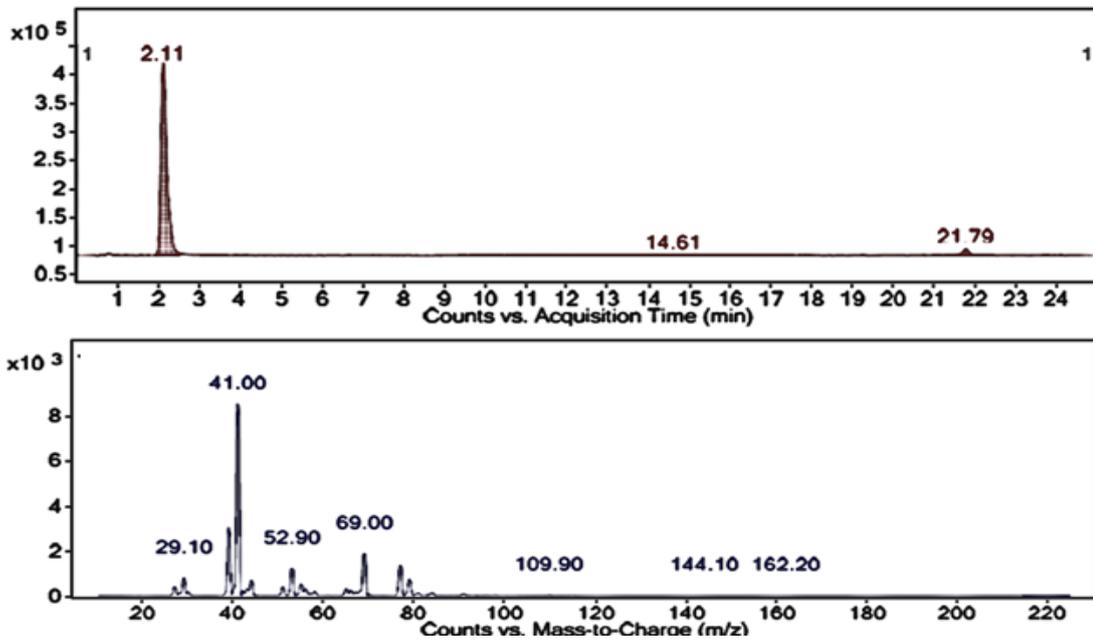


Figura 35 – TIC referente ao m/z 222 com espectro de fragmentação de FOCM, obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo positivo, Product Ion.

O último órgão analisado por UHPLC-DAD-ESI-MS foi RM, os resultados podem ser observados na figura 36. Um pico de TR= 2,40 foi registrado no TIC, e abaixo o espectro de massas gerado a partir da análise de produto de íon

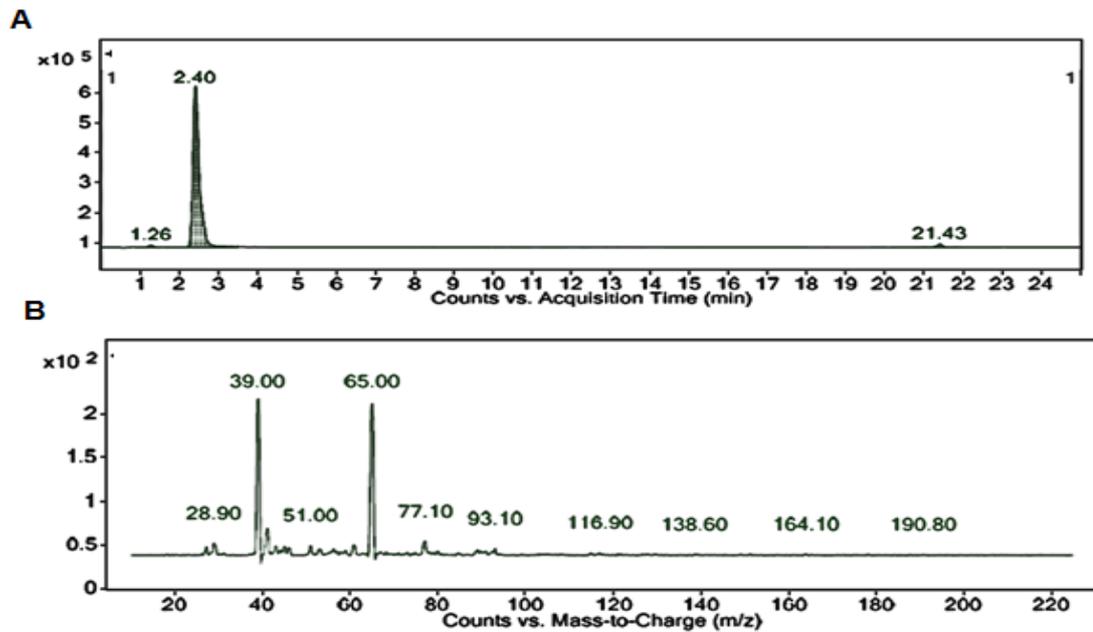


Figura 36 – TIC referente ao m/z 222 com espectro de fragmentação de RM, obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em modo positivo, ESI Product Ion.

Observa-se na Tabela 3, que não existem diferenças significativas nas perdas de unidades de massa entre as frações metanólica e acetato de etila de FOCL, houve uma diferença de 0,11 minutos no tempo de retenção da substância em análise, mas com perfil de fragmentação semelhante entre estas amostras. Em RZ, o perfil é diferente, utilizando as mesmas condições cromatográficas de FOCM e FOCAE, o m/z 222 elui em 2,40 minutos (Figura 36 A), mas o perfil de fragmentação é diferente do observado em FOCL, nota-se a presença de dois fragmentos mais abundantes nesta amostra com m/z 29 e m/z 65 (Figura 36 B).

Tabela 3 - Perfil de fragmentação do espectro de massas

AMOSTRA	RT	M+	MH+	Fragmentação	Perdas de unidades de massas
FOCM	2.22	221	222	69; 53;41; 29.1	-153; -16; -12; -11.9
FOCAE	2.11	221	222	69; 53; 41; 29.1	-153;-16;-12;-11.9
RM	2.40	221	222	77.10;65;51;39;29	-144.9;-12.1;-14;-12;10

Durante a análise do Produto de íon (Product ion) alguns fragmentos foram propostos, o fragmento m/z 69 presente em FOCM e FOCAE pode corresponder ao grupo isobutilnitrila ($C_4H_7N^+$), o m/z 53 pode ser equivalente a $C_3H_3N^+$, para o fragmento m/z 41 pode ser atribuído ao grupo $C_2H_3N^+$ e a formação do fragmento m/z 29 sugere-se a perda do grupo carbonila, presente na molécula do espilantol.

Bae et al (2010) desenvolveram uma metodologia para analisar o espilantol usando LC-ESI-MS e tecnologia Ion Trap, assim detectaram o pico base m/z= 222,2 e o fragmento m/z=149 que foi associado à ruptura da ligação C-N e a perda de todo o grupo amina, os autores ainda detectaram o fragmento m/z=123 que atribuem à perda do grupo C_5H_9NO , e o m/z 67, valor muito próximo ao encontrado neste trabalho, porém os autores não especificaram a estrutura deste fragmento. Singh e Chattuverdi (2012) detectaram espilantol nas folhas de *Spilanthes acmella*, usando também ionização por ESI, através do pico base m/z=222 e relatam a ocorrência do fragmento m/z=99. Este sinal pode corresponder ao fragmento C_5H_9NO , possível isocianato de isobutila.

Alguns aspectos sobre a fragmentação devem ser levados em consideração, a formação de poucos fragmentos durante a análise pode ser explicada pela energia aplicada (70V), tendo em vista que o espilantol é uma molécula instável, quanto maior a energia aplicada, maior a instabilidade, então maior a possibilidade de fragmentação, portanto uma opção de análise produzindo fragmentos de baixo peso molecular desta molécula seria a ionização por APCI, ou ainda reduzir ainda mais a energia aplicada na análise por ESI.

Durante as análises de FOCAE, foi detectado um pico com TR= 8,67 em 365 nm, área 4596 correspondente a 30.19% com fase móvel etanol/água com $\lambda= 280$, $\lambda= 315$ e $\lambda=360$, e outro pico com TR= 9,25 também em 365 nm de área 4689 correspondente a 23.2% e $\lambda=280$ e $\lambda= 365$, porém com a fase móvel constituída por acetronitrila/água (Figura 37).

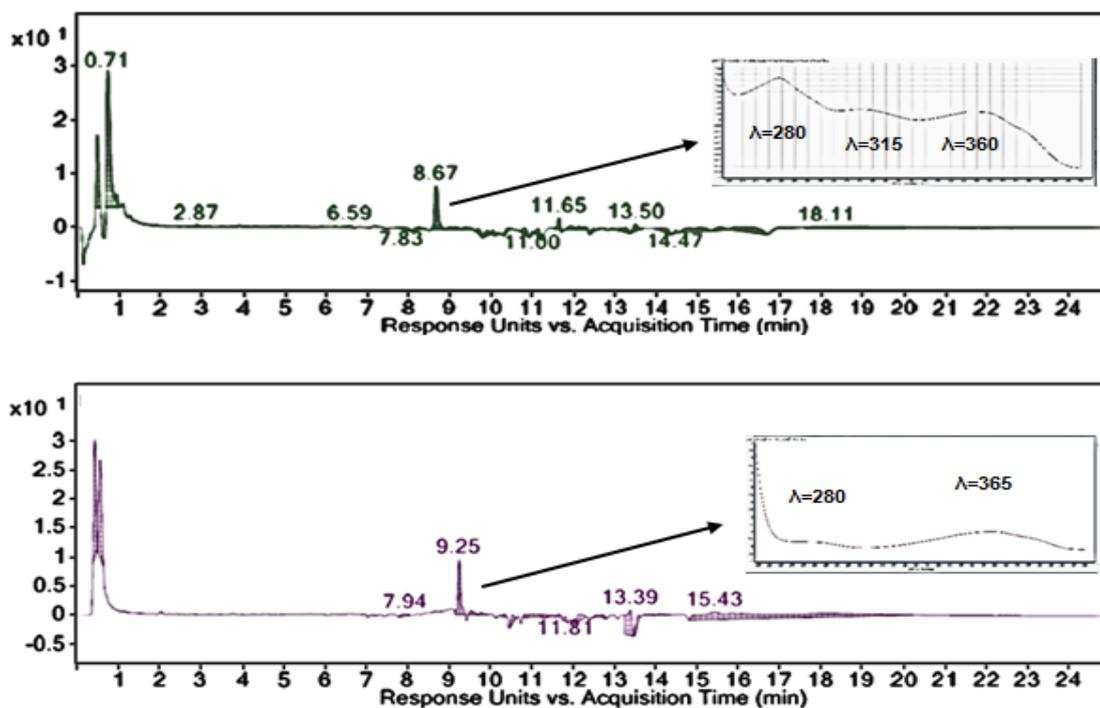


Figura 37- Cromatogramas de FOCAE obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS em 365 nm para Fase móvel etoh/agua e ACN/agua, respectivamente.

Na análise por espectrometria de massas destes picos em modo Full Scan foram obtidos os espectros com m/z 376.80 para FOCAE, analisada com Fase móvel etoh/água e com m/z 388.20 em ACN/AGUA (Figura 38).

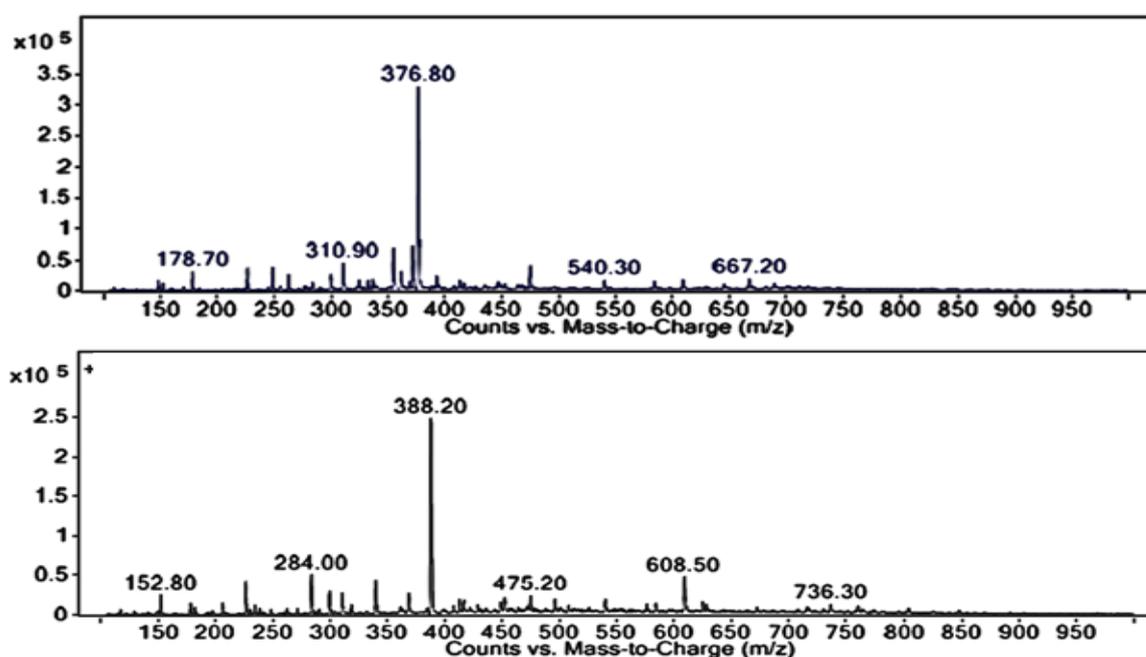


Figura 38- Espectros de massa obtidos por UHPLC-DAD-ESI-MS no modo positivo, Scan de FOCAE.

Quanto as análises por DAD nos dois momentos, de acordo com Silverstein (1991), é possível sugerir a presença de compostos contendo cromóforo carbonila, que absorvem na faixa de 270-300 nm, ou ainda a presença de aldeídos e cetonas α , β – insaturadas, que tem sua absorção na faixa de 310-330 nm. Com relação a classe metabólica, os resultados indicam a presença de flavonoides, tendo em vista que algumas subclasses absorvem na faixa de 365 nm, como as flavonas e biflavonóis de acordo com Harborne (1992).

Nas análises por ESI-MS, não há relatos até o momento sobre os fragmentos identificados na Figura 39 em *Acmella oleracea*. Em 1986, Timmermann et al, relataram a presença do m/z 376 em *Grindelia discoidea* (Asteraceae), na oportunidade os autores associaram este fragmento a um diterpenoide. Para o m/z 388 há relatos da presença de núcleo flavonol na família Asteraceae, em um trabalho realizado por Queiroz et al (2005) na planta *Blumea gariépina*.

A presença de flavonoides na planta precisa ser confirmada por experimentos específicos, os relatos de detecção por UHPLC-MS desta classe para o gênero *Acmella* ainda são escassos, a maioria destes relatos estão ligados a ensaios farmacológicos realizados.

Dubey et al (2013) em uma revisão de literatura, cita estudos que comprovam a presença de flavonoides no extrato etanólico das folhas de *Spilanthes acmella* e ainda associa a presença destes metabólitos ao potencial antioxidante da planta, porém o autor não relata como se deu esta identificação, e como os ensaios farmacológicos foram conduzidos. Chakraborty et al (2011) ao comprovar o efeito antipirético de *Spilanthes acmella*, atribuiu este efeito a presença de flavonoides na planta por esta classe inibir a ciclo-oxigenase ou a lipo-oxigenase, mas baseado em uma abordagem fitoquímica com reagente de Wagner e 5% e solução de cloreto férrico 5%, não em métodos espectroscópicos que permitissem a confirmação da presença dos metabólitos.

Durante um ensaio para determinar atividade antimicrobiana de *Acmella paniculata*, Mamidala e Gujetti (2013), detectaram em toda a planta, mas também por abordagem fitoquímica. Em 2015, Romão et al, determinaram o potencial antioxidante das flores de *Spilanthes acmella*, na oportunidade os autores identificaram e quantificaram o teor de flavonoides totais por espectrofotometria.

5.6 Uso de Etanol como fase móvel

Durante o desenvolvimento das programações para análises de FOCM e RZM foram utilizados etanol e água como componentes da fase móvel, a fim de verificar o perfil dos cromatogramas e comparar com os resultados obtidos com acetonitrila (Figura 39).

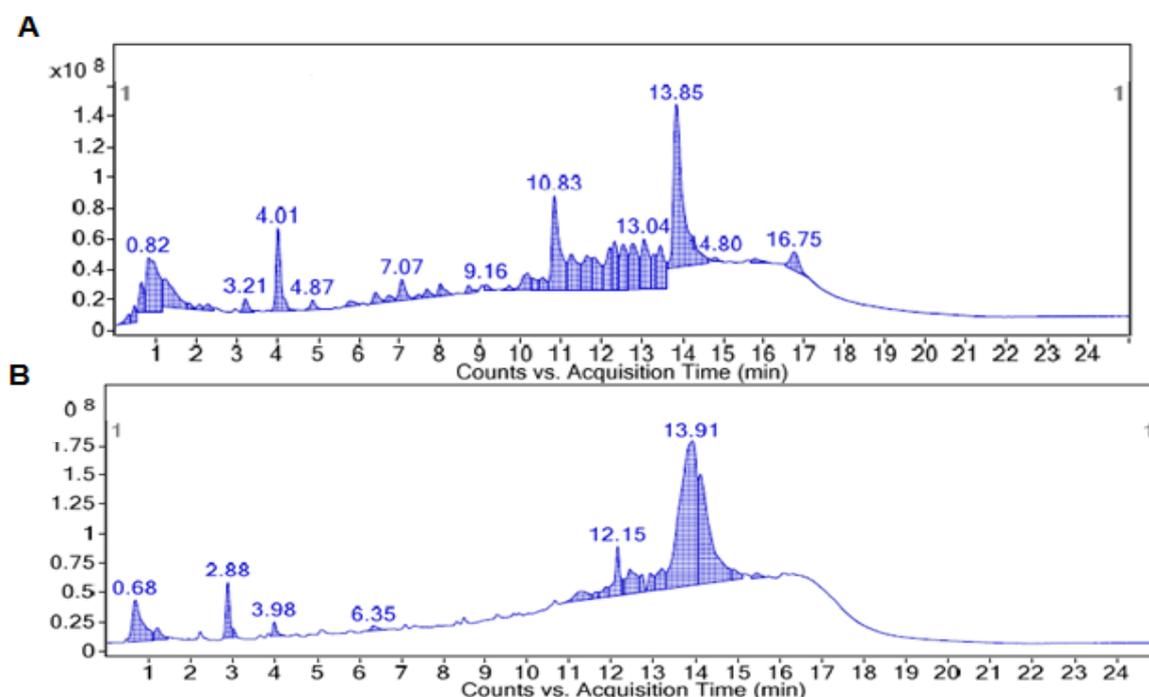


Figura 39- Cromatograma de íons totais (TIC) de FOCM com ETOH/água (A) e ACN/água (B)

Observa-se que a separação dos picos em FOCM ocorre melhor quando o eluente é composto por etanol e água. O uso do etanol justifica-se pela característica de média polaridade da amostra, observada durante o desenvolvimento do trabalho.

O uso de etanol como fase móvel já é descrito na literatura, Aragão et al (2009) utilizaram o eluente na separação de metilxantinas e obtiveram resultado satisfatório, alegando que a separação do analito foi melhor com o uso de etanol/água, os autores ainda ressaltam que a utilização deste sistema eluente pode contribuir para a difusão da química segura, por ser menos tóxico que sistemas formados com metanol e acetonitrila.

O sistema etanol/água também foi utilizado por Zamariola e Marchi (2014) para determinação de aflatoxina B1, na oportunidade, os autores reiteram a questão da química segura com o uso de etanol em sistemas cromatográficos, podendo este substituir solventes de elevada toxicidade. Lanças (2009) também já relatava alternativas para minimizar e /ou eliminar o uso de ACN na Química analítica, dentre elas a substituição pelo etanol. Ribeiro (1999) reafirma que o etanol pode ser utilizado na rotina de análises cromatográficas por ser menos tóxico e por ter resultados semelhantes a performance de acetonitrila e metanol.

Uma desvantagem sobre o uso desta fase é a dificuldade em controlar a pressão no sistema, pois a viscosidade deste solvente é muito alta, este problema também foi observado neste trabalho e relatado pelos autores acima.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta uma contribuição a literatura no que consiste aos dados presentes sobre o gênero *Acmella* e a espécie *Acmella oleracea*. Uma substância que apresenta perfil promissor foi encontrada através das análises por UHPLC-DAD-ESI-MS e precisa experimentos específicos, como a análise de Produto de Ion, para a confirmação de flavonoides.

O espilantol, uma substância de interesse e já conhecida na literatura foi identificada em todas as partes analisadas por HPLC-DAD-EM e UHPLC-DAD-ESI-MS, alguns pontos da fragmentação foram identificados (m/z 69, m/z 53, m/z 41 e m/z 29).

Quanto as análises cromatográficas, os melhores perfis para FOCM e RM foram obtidos quando a fase móvel era composta por etanol e água. O uso do etanol justifica-se pela característica de média polaridade da amostra, observada durante o desenvolvimento do trabalho.

As programações descritas neste trabalho para as análises cromatográficas podem ser utilizadas como forma de monitoramento de substâncias marcadoras (espilantol) em amostras manejadas agronomicamente.

7 REFERÊNCIAS

ABEYSIRI, G. R. P. I. et al. Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Acmella oleraceae* Murr.(Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 852-856, 2013.

ALCANTARA, B. N. et al. Pharmacognostic analyses and evaluation of the in vitro antimicrobial activity of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen (Jambu) floral extract and fractions. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 4, p. 91-96, 2015.

ARAGÃO, N. M. ET AL. Efeito da acidez e de modificadores orgânicos na determinação de metilxantinas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando otimização uni e multivariada. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2482-2486, 2009.

ARDREY, R. E.; *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, **Wiley: Huddersfield**, 2003.

BAE, STACY S. ET AL. A validated liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 5, p. 438-443, 2010.

BARBOSA, A.F., ET AL. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. (2015).

BARBOSA, W. L. R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I.C.C.; PINTO, L. N.; OLIVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. **Revista Científica da UFPA**. Vol. 4, 2012.

BOONEN, J., BAERT, B., ROCHE, N., BURVENICH, C., DE SPIEGELEER, B., 2010. Transdermal behaviour of the N-alkylamidespilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella*, (Compositae) extracts. **Journal of Ethno pharmacology** 127, 77–84.

BORGES, L. S. ET AL. Produtividade e acúmulo de nutrientes em plantas de jambu, sob adubação orgânica e mineral. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 83-94, jan./fev. 2013

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de hortaliças não-convencionais / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo**. – Brasília : Mapa/ACS, 2010.92 p.

CHAKRABORTY, A. ET AL. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. **Indian Pharmacological Society**. 2011.

CIESLA, L.; **Chromatogr. Res. Int.** 2012, 2012, 1.

COLLINS, C. H. **Fundamentos de cromatografia**. Editorada Unicamp, 2006.

CROTTI, A. E. M. ET AL. Electrospray ionization mass spectrometry: chemical processes involved in the ion formation from low molecular weight organic compounds. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DA SILVA BORGES, L.; GOTO, R.; LIMA, G. P. P. Índices morfo-fisiológicos e produtividade de cultivares de jambu influenciada pela adubação orgânica e mineral= Morpho-physiological indices and economic productivity of jambu cultivars influenced by the organic and mineral fertilizers. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, 2014.

DE OLIVEIRA, D. C. R. ET AL. Elaboração e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de pasta de alho condimentada com jambú (*Spilantes oleraceae* L.) desidratado. **Scientia Plena**, v. 10, n. 1, 2014.

DIAS, A.M.A., SANTOSA, P., SEABRA, I.J., JÚNIOR, R.N.C., BRAGA, M.E.M., DE SOUSA, H.C. Spilanthol from *Spilantes acmella*, flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**. 2011

DRASARA P, MORAVCOVA J 2004. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. **J Chromatogr B** 812: 3-21.

DUBEY, SUCHITA ET AL. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilantes acmella*: a review. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2013, 2013.

ESPADA, A.; MARTIN, M. M.; DAGE J.; KUO, M. S. Application of LC/MS and related techniques to high-throughput drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9, 2008

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. Stuttgart: Thieme, 2008.

FAMEI L, ZHILI X, XIUMEI L, FENG Q, XIAOQIN L. Strategy and chromatographic technology of quality control for traditional chinese medicines. **Chin J Chromatogr** 24:537-544. 2006

FELIX-SILVA, J. et al. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 548-555, 2012.

HEBBAR, S.S., HARSHA, V.H., SHRIPATHI, V., HEGDE, G.R., Ethnomedicine of Dhar-wad district in Karnataka, India—plants used in oral health care. **Journal of Ethnopharmacology** 94, 261–266. 2004.

HOMMA, Alfredo Kingo Oyama et al. Etnocultivo do jambu para abastecimento da cidade de Belém, estado do Pará. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 6, p. 125-142, 2011.

JOSHI RR, GUPTA KR AND PATIL SS: Hyphenated Technique- A Boon to Analytical World. **Int J Pharm Sci Res**. 3(11); 4184-4191.

- JIANG, Y.; DAVID, B.; TU, P.; BARBIN, Y.; ANAL. **Chim. Acta** 2010, 657, 9
- KITE, G. C.; VEITECH, N. C.; GRAYER, R. J.; SIMMONDS, M. S. J. The use of hiphenated techniques in comparative phytochemical studies of legumes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 813-843, 2003
- LANÇAS, FERNANDO M. ET AL. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
- LANÇAS, F. M. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “crise”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 51-60, 2009.
- LENDIA, B.E., MEYER,V.R., **LC GC Europe** 18, (2005) 156
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. 2002. *Plantas Mediciniais no Brasil – Nativas e Exóticas*. São Paulo, **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**. 544p.
- MAMIDALA, E.; GUJJETI, R P. Phytochemical and antimicrobial activity of *Acmella paniculata* plant extracts. **J. Bio Innov**, v. 1, p. 17-22, 2013.
- MARÍA YOLANDA RIOS. Natural Alkamides: Pharmacology, Chemistry and Distribution, Drug Discovery Research in Pharmacognosy, Prof. Omboon Vallisuta (Ed.), ISBN: 978-953-51-0213-7, InTech (2012)., Available from: <http://www.intechopen.com/books/drug-discovery-researchinpharmacognosy/natural-alkamidespharmacology-chemistry-and-distribution>.
- MBEUNKUI, F ET AL. Isolation and identification of antiplasmodial N-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 21, p. 1886-1892, 2011.
- McMURRY, J., **Química Orgânica** vol. 1 e vol. 2. Editora CENGAGE Learning. Tradução da 6ª Edição Norte Americana, 2008KOTZ, John C.; TREICHEL
- MUSA, M A.; COOPERWOOD, J S.; KHAN, M. O F. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 26, p. 2664, 2008.
- NOMURA, E. C. O. ET AL. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 583-589, 2013.
- PRACHAYASITTIKUL, S. ET AL. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v. 14, n. 2, p. 850-867, 2009.
- PORTO, H. S. M. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra.

QUEIROZ, E. F. ET AL. On-line identification of the bioactive compounds from *Blumea gariepina* by HPLC-UV-MS and HPLC-UV-NMR, combined with HPLC-micro-fractionation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 3, p. 166-174, 2005.

QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 2, n. 03, 2013.

RAHMAN, ATTA-UR-, **Studies in Natural Products Chemistry**.Vol. 43. Elsevier, Oxford, Englad., 2014.

RATNASOORIYA, W.D., PIERIS, K.P.P., SAMARATUNGA, U., JAYAKODY, J.R.A.C., 2004. Diureticactivity of *Spilanthes acmella*, flowers in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 91,317–320

RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J.; NAIR, MURALEEDHARAN G. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729-732, 1999.

RIBEIRO. R. L. V. **Uso do etanol como modificador orgânico de fase móvel para cromatografia líquida de alta eficiência**. 1999. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Insituto de Química.

RODRIGUES, M. V. N. ET AL. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Revista de Multiciência**, v. 7, 2006.

RODDY, T. P.; HORVATH, C. R.; STOUT, S. J.; KENNEY, K .L.; HO, P.; ZHANG, J.; VICKERS, C.; KAUSHIK, V.; HUBBARD, B.; WANG, Y. K. Mass spectrometric techniques for label-free high-throughput screening in drug discovery. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 8207-8213, 2007.

ROMÃO, N. F. ET AL. ANÁLISE DO PERFIL FITOQUÍMICO, POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DAS FLORES DE *Spilanthes acmella*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 2, 2015.

SANTOS, D. S. Desenvolvimento de Método por CLAE-DAD para Determinação de Espilantol em *Spilanthes acmella* (L.) Murray. **Dissertação (Mestrado em Química)** – Programa de Pós Graduação em Química , Universidade Federal de Sergipe, 2010.

SHANTHI, P., AMUDHA, P.Evaluation of the phytochemical constituents of *Acmella calva* (DC.) R. K. JANSEN. **International Journal of Pharma and Bio Sci-ences** 1, 308–314. 2010.

SHARANABASAPPA, G.K., SANTOSH, M.K., SHAILA, D., SEETHARAM, Y.N., SANJEEVARAO,I. Phytochemical Studies on *Bauhinia racemosa* Lam., *Bauhinia pur-purea* Linn. and *Hardwickia binate* Roxb. **Journal of Chemistry** 4, 21–31. 2007

SINGH, M.; CHATURVEDI, R.. Evaluation of nutrient uptake and physical parameters on cell biomass growth and production of spilanthol in suspension

cultures of *Spilanthes acmella* Murr. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 35, n. 6, p. 943-951, 2012

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F.; WATSON, D.; *Chromatographia* **2002**, 55, 95

SPELMAN, K. ET AL. The Traditional Medicine *Spilanthes acmella*, and the Alkylamides Spilanthol and Undeca-2E-ene-8, 10-diynoic Acid Isobutylamide, Demonstrate In Vitro and In Vivo Antimalarial Activity. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 7, p. 1098-1101, 2011.

SUSMITHA S ET AL. Studies on *in-vitro* Anti-inflammatory activity of *Acmella oleracea* metabolic compounds. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**. Volume 8 Issue 2. 2015

TIMMERMANN, B. N. ET AL. Labdane diterpenoids from *Grindelia discoidea* (asteraceae). **Phytochemistry**, v. 25, n. 6, p. 1389-1392, 1986.

URANO, R. P. M.; RODRIGUES, F. T.; BERLINCK, R. G.S. Utilização de detecção por espalhamento de luz evaporativo para a análise de produtos naturais. **Quim. Nova**, v. 35, n. 6, p. 1198-1208, 2012.

VÉKEY, K.; *J. Chromatogr., A* **2001**, 921, 227.

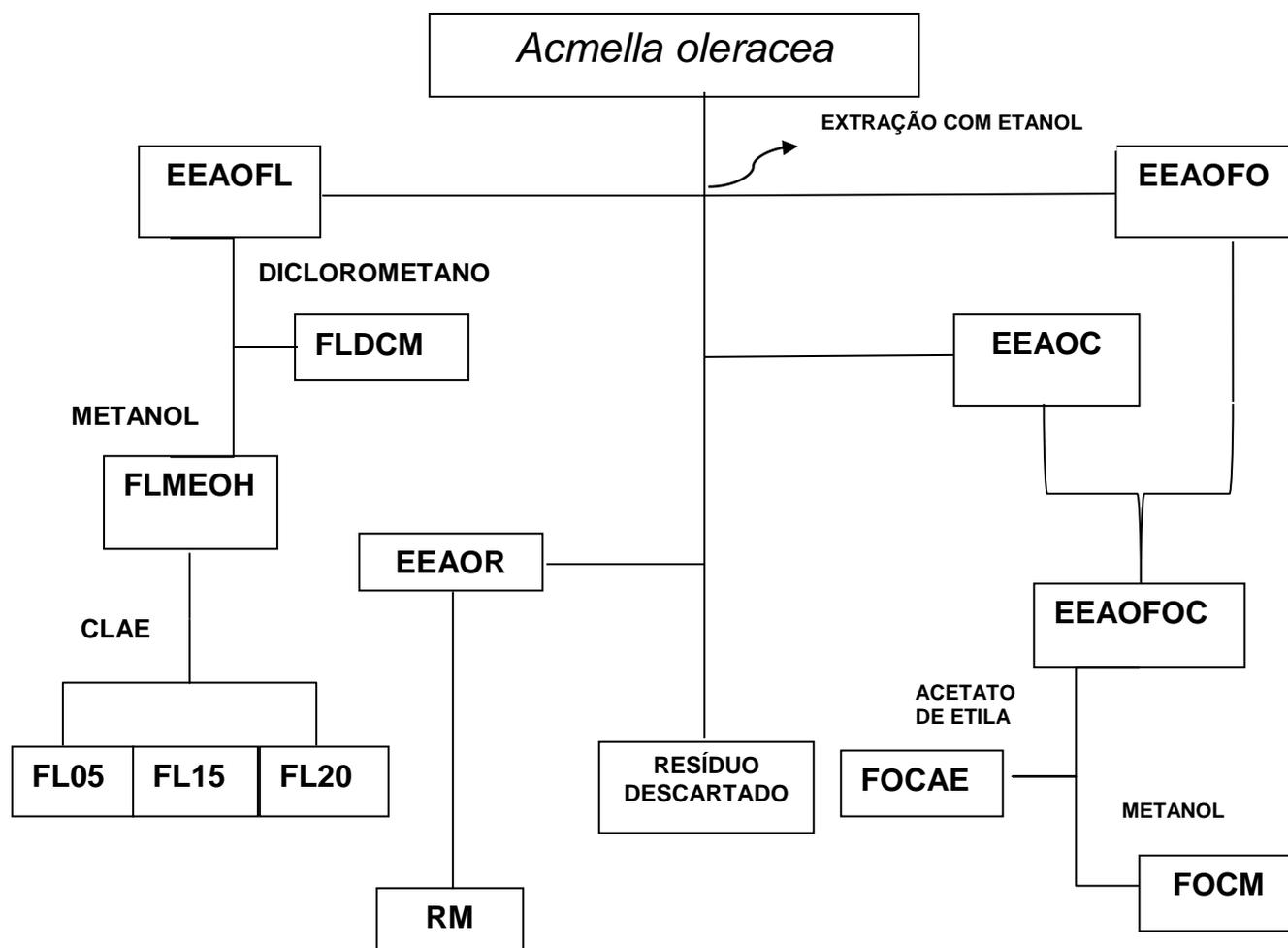
ZAMARIOLA, N.; MARCHI, M. R. R. DE. Química verde: uso de etanol como fase móvel na determinação de aflatoxina B1 e zearalenona, por HPLC-FLD. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**. 37a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.2014.

WAGNER, H., BLADT, S., **Plant drug analysis A thin layer chromatography atlas**, 2a ed, Berlim, Springer, 2001.

WOLFENDER, J. L.; *Nat. Prod. Commun.* 2009, 10, 1417.

WONGSAWATKUL, O. et al. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 12, p. 2724-2744, 2008.

APENDICE A – Origem das siglas de extratos e frações



Legenda:

EAAOFL: Extrato etanoico de *Acmella oleracea* – Flor;

EAAOC: Extrato etanoico de *Acmella oleracea* – Caule;

EAAOFO: Extrato etanoico de *Acmella oleracea* – Folha;

EAAOR: Extrato etanoico de *Acmella oleracea* – Raiz;

EAAOFOC: Extrato etanoico de *Acmella oleracea* Folha+Caule;

FLMEOH: Flor fração metanólica;

FLDCM : Flor fração diclorometano;

FL05: Flor 0 a 5 minutos;

FL15: Flor 15 minutos;

FL20: Flor 20 minutos;

FOCM: Folha+Caule fração metanólica;

FOCAE: Folha+Caule fração acetato de etila;

RM: Raiz fração metanólica